

ХЕМИСКА КОНТРОЛА НА КВАЛИТЕТ НА ПРОИЗВОДИТЕ

-Нерецензирана Скрипта за Студентите од Вториот Циклус (Постдипломски студии) при Земјоделскиот Факултет при Универзитетот „Гоце Делчев“-Штип

-Катедра за преработка и контрола на земјоделските производи-

проф. д-р Рубин Гулабоски

1. Вовед

Анализата на храна е дисциплина што се занимава со развој на аналитички постапки за карактеризирање на својствата на храната и нивните составни делови. Овие аналитички процедури се користат за да се обезбеди широк спектар на информации за различни карактеристики на храната и производите, вклучувајќи го нивниот состав, структура, физичко-хемиските својства и нивните сензорни карактеристики. Овие информации се од клучно значење за разбирање на факторите од кои зависат својствата на храната, како и на нашата способност да се произведува храна што е постојано безбедна, здрава и посакувана за потрошувачите. Целта на овој курс е да се разгледаат основните принципи на аналитичките постапки што најчесто се користат при анализа на храна, при што ќе се дискутира за примената на некои аналитички методи за определување на специфични компоненти во храната, на пример, липиди, протеини, вода, јаглени хидрати и минерали.

2. Причини за анализа на храната

Храната се анализира од страна на обучени лица што работат во сите основни сектори на прехранбената индустрија. Анализата на храна обично ја вршат производителите, добавувачите, специјализирани аналитички лаборатории, владините лаборатории и Универзитетски истражувачки лаборатории. Различните цели поради кои се анализира храната се накратко дискутирани во наредниот дел од скриптата.

3. Стандарди

Владините агенции имаат одреден број на задолжителни стандарди во поглед на составот, квалитетот, инспекцијата и етикетирање на прехранбените производи.

Задолжителни стандарди:

- *Стандарди на идентитетот.* Со овие прописи се дефинира видот и количината на состојки што одредени видови храна мора да ги содржат, а сето тоа мора да биде јасно означено на етикетата за храна. За некои храни дадени се и максимум или минимум концентрации на одредени компоненти. На пример, "путер од кикиритки" мора да има помалку од 55% масленост, "сладоледот" мора да содржи повеќе од 10% млечна маст, "Фета сирење" мора да содржи повеќе од 50% млечна маст и помалку 39% влага итн.
- *стандарди за квалитет:* Стандардите за квалитет се дефинирани за одредени храни (на пример, конзервирано овошје и зеленчук) каде се дефинираат минималните барања на боја, нежност, маса и дефекти.
- *Стандарди на пополнетост на садот.* Овие стандарди јасно кажуваат во колкава мера треба да биде полн садот или амбалажата во која е спакувана храната за да се избегне измама врз потрошувачите, како и специфицирање на начинот со кој се мери пополнетоста на амбалажата.

Дополнителни стандарди (по слободен избор на производителот):

- *Стандарди на степен на квалитет:* Голем број на храна, вклучувајќи месо, млечни производи и јајца се категоризирани според нивниот квалитет. На пример, месото може да се класифицира како "премиер", "избор", "одбрано", "стандард" и сл. според неговото потекло, нежност, ровкост, вкус и изглед. Постојат јасни дефиниции поврзани со овие дескриптори дека производите мора да одговараат на пропишаните стандарди пред да им се даде соодветна етикета. Спецификацијата на одделението за прехранбени производи на етикетата е по слободен избор, но многу производители на храна одлучуваат да се направи тоа затоа што чувствуваат дека на тој начин производите може да се продадат за повисока

цена. Владата има лаборатории каде производителите на храна ги испраќаат своите производи да се тестираат, со цел да се стекнат со соодветна потврда за квалитетот на нивниот продукт. Оваа услуга бара и дополнителни парични средства од страна на производителот на храната.

Инспекција на храна, класифицирање и оценување на квалитетот на храната

Секоја влада има формирано Агенција за инспекција на храна, чија задача е да врши рутински анализи на својствата на прехранбени производи за да се осигури дека тие ги исполнуваат соодветни закони и прописи. Притоа, и на оваа владина агенција и на производителите на храна им требаат аналитички техники со цел да се обезбеди соодветна информација за својствата на храната. Најважните критериуми за овој вид на тест се точноста на мерењата и употребата на официјални методи за анализа. Секоја влада има преглед на точно дефинирани аналитички техники развиени и прифатени за анализи на храна, при што точно е утврдено кои техники треба да се користат за анализирање на одредени прехранбени компоненти. Техниките се селектирани и прифатени во другите земји и тие обезбедуваат точни и сигурни резултати, а ракувањето со нив е релативно едноставно и ефтино.

1.1.2. Безбедност на храната

Една од најважните причини за анализа на храна и од потрошувачите и производителите е да се осигура дека тие се безбедни. Доколку производителите продаваат производи што би биле штетни или отровни, тогаш тоа би значело економски пропаст на производителот и негово исчезнување од пазарот, а последици може да се јават и по здравјето на потрошувачите. Дадена храна може да се смета за безбедна доколку не содржи штетни микроорганизми (на пример, *Listeria*, *Salmonella*), токсичните хемикалии (на пример, пестициди, хербициди) или страни предмети (на пример, стакло, дрво, метал, инсекти и сл). Затоа е важно производителите на храна да сторат сè што е во нивна моќ за да се осигураат дека овие штетни супстанции не се присутни во храната, или дека тие се

ефективно отстранети пред храната да стигне до потрошувачите. Ова може да се постигне со спроведување на "добра производна пракса" т.е. на спроведување на регулативите определени од страна на владата и владините агенции за одредени прехранбени производи. Контролата на квалитетот на храната се врши со употреба на аналитички техники што се способни за детектирање на штетни материи. Во многу ситуации важно е да се користат аналитички техники што имаат висока чувствителност, односно со овие техники со голема сигурност може да се детектираат ниски концентрации на штетни материи. Производителите на храна и владините лаборатории вршат рутински анализи на прехранбени производи со цел да контролираат дека храната не содржи штетни материи и дека производството на храна во објектот функционира правилно.

1.1.3. *Контрола на квалитет*

Прехранбената индустрија е високо конкурентна и производителите на храна постојано се обидуваат да ги зголемат своите удели на пазарот и да остварат поголеми профити. За да го направат тоа, тие мора да бидат сигурни дека нивните производи се со повисок квалитет, помалку скапи, и повеќе барани од продуктите на нивните конкуренти.

Притоа, производителите на храна треба да гарантираат дека нивните производи се безбедни и хранливи. Со цел да ги исполнат овие ригорозни стандарди за квалитетот на храната, производителите треба да поседуваат аналитички техники за анализа на хранливите материи пред, за време, и после процесот на производство, со цел да се осигури дека крајниот производ ги задоволува посакуваните стандарди. Во фабриките за производство на храна, процесот на контрола започнува уште при приемот на сировините, продолжува со процесот на преработка на сировините, како и при добивањето на готов производ и при пласманот на производот на пазарот. Една од најважните задачи на производителите на храна е да се произведе финален производ што постојано ги има истите физички и хемиски својства, како што се изглед, состав, вкус и рок на траење. Кога ќе купиме одреден производ, ние очекуваме неговите својства да бидат исти (или многу слични) со претходните времиња, а не да се разликуваат континуирано. За жал, својствата на сировините и состојките при обработка зависат од многу услови и се разликуваат од

време на време. Тоа предизвикува својствата на конечниот производ да се разликуваат во различни периоди, често на непредвидлив начин. Како може производителите на храна да имаат контрола врз овие варијации? Прво, тие можат да разберат на кој начин различни прехранбени состојки при операциите на обработка играат улога во одредувањето на конечните својства на храната. Притоа, производителите на храна може рационално да го контролираат процесот до производство на финален производ со конзистентни својства. Овој тип на информации може да се утврди преку истражување и развој во работата. Второ, производителите на храна можат да ги следат својствата на храната во текот на производството за да се осигураат дали се исполнети одредени барања. Доколку проблемот се детектира во текот на процесот на производство, тогаш навремено може да се превземат соодветни дејства со цел да се одржи финалниот квалитет на производот.

Карактеризација на сировини

Производителите на храна треба континуирано да ги контролираат својствата на влезните сировини со цел да се осигураат дека тие исполнуваат одредени минимални стандарди за квалитет што претходно се дефинирани. Дури и кога својствата на сировините се прифатливи, варијациите во нивните својства може да доведат до промени во својствата на конечниот производ. Со анализа на сировини често е можно да се предвиди нивното последователно однесување за време на процесот на обработка. Во таков случај може да бидат изменети условите за обработка со цел да се произведе финален производ со посакувани својства. На пример, бојата на чипсот зависи од концентрацијата на шеќери во компирот: колку е поголема концентрацијата на скроб, толку чипсот е покафеав. Затоа е потребно да се има аналитичка техника за мерење на концентрација на шеќери во компирот. На таков начин ќе се обезбедат соодветни услови при пржењето за да може да биде произведен чипс со оптимална обоеност.

Мониторинг на својствата на храната за време на процесот

Многу е важно производителите на храна да можат да ги мерат својствата на храната за време на процесот на обработка. Така, ако се појави било каков проблем, тој може да биде детектиран брзо, и процесот може да се преадаптира за да се компензира појавениот недостаток. Ова помага за подобрување на севкупниот квалитет на храната, при што се намалуваат трошоците за потрошен материјал и залудно потрошеното време. На пример, ако производителот произведува млеко, и доколку притоа содржината на масти или масла е премногу ниска или премногу висока во млекото, тогаш можно е тој проблем да се надмине со тоа што процесот ќе се предимензионира и приспособи на новите услови. Најчесто во текот на процесот се земаат примероци од производите, и истите се носат во лабораторија каде што се испитува квалитетот на производите уште во текот на процесот на преработка. Бидејќи оваа постапка одзема доста време, во денешни услови се употребуваат анализатори што директно (уште за време на постапката на преработување) можат да вршат анализи и да дадат информации за квалитетот на производите.

Карактеризација на конечниот производ

Откако производот е направен, важно е да се анализираат неговите својства со цел да бидеме сигурни дека тој ги исполнува соодветните правни критериуми и барања што се обележани на амбалажата од производот, дека е безбеден и дека е со висок квалитет. Притоа, важно е да се осигура дека производот ги задржува неговите посакувани својства до времето кога тој се конзумира. Системот познат како **Hazard Analysis and Critical Control Point** (НАССР) е од поодамна развиен, чија цел е систематски да ги идентификува состојките или процесите што можат да предизвикаат проблеми (опасна анализа) и да ги лоцира локациите (критичните контролни точки) во рамките на процесот на производство. При овој процес, својствата на храна мора да се мерат со цел да се осигури дека безбедноста и квалитетот на производите се одржуваат на бараните нивоа, при што се превземаат соодветни мерки доколку проблемот е идентификуван. Производителот мора да води детална документација за ефикасноста и резултатите на овие тестови. НАССР

првично беше развиена за безбедносно тестирање на храна, но денес истиот се користи за тестирање на квалитетот на храната.

1.1.4. Истражување и развој

Во последниве години постојат значителни промени во поглед на желбите на потрошувачите на храна за купување и конзумирање на поздрава храна, храна со повисок квалитет, со пониска цена и поегзотична храна. Индивидуалните производители на храна мора да одговорат многу брзо на барањата на потрошувачите со цел да останат конкурентни во индустријата за храна. За да ги реализираат овие барања, многу често производителите на храна вработуваат голем број на научници, чија примарна задача е да вршат научни истражувања што ќе доведат до развој на нови продукти, подобрување на квалитетот на веќе постоечките продукти и до намалување на трошоците. Голем број на научници што работат на универзитетите во истражувачки лаборатории или во фабриките за храна прават базични научни истражувања. Тие вршат експерименти чии резултати доведуваат за подобро разбирање на влијанието на различните состојки и на процесните операции во определувањето на крајните својства на продуктите. Научните испитувања главно се ориентирани кон испитувањето на структурата и интеракциите помеѓу состојките во храната, како и на влијанието на надворешните услови (температура, притисок, механички влијанија) врз својствата на состојките на храната и производите. Знаењата здобиени од базичните експерименти многу често се употребуваат во процесот на развој на продукти. Притоа, резултатите од базичните експерименти многу им помагаат на научниците што работат во секторот за развој на продукти да ги рационализираат и оптимизираат својствата на храната и на новите продукти што треба да ги развијаат. И во базичните истражувања, и во истражувањата при развојот на нови продукти, неопходни се аналитички техники за да се карактеризираат вкупните својства на храната (боја, состав, мирис, вкус) со цел да се утврди улогата на секоја состојка во производствениот процес, и да се утврди како својствата на храната се зависни од условите при процесите на производство (складирање, загревање, мешање, мрзнење и сл).

1.2 *Анализирани Својства*

Аналитичарите на храна се заинтересирани за добивање на информации по поглед на различни параметри што влијаат врз квалитетот на храната, како што се составот, структурата, физичко-хемиските својства и сензорните карактеристики.

1.2.1 *Состав*

Составот на храната во голема мера ја одредува нејзината безбедност, хранливата вредност, физичко-хемиските својства, како и квалитетот и сензорните карактеристики на истата. Повеќето хранливи производи се изградени од комплексни материјали, составени од широк спектар на различни хемиски конституенти. Составот на храната може да биде претставен на голем број на начини во зависност од својствата што се од интерес на аналитичарот и видот на аналитичките процедури што се користат: специфични атоми (на пример, јаглерод, водород, кислород, азот, сулфур, натриум, итн); специфични молекули (на пример, вода, сахароза, тристеарин, β -лактоглобулин), видови на молекули (на пример, масти, протеини, јагленохидрати, растителни влакна, минерали) или пак специфични супстанции (на пример, грашок, брашно, млеко, кикиритки, путер). Владините прописи укажуваат на тоа дека концентрациите на некои специфични прехранбени компоненти треба да бидат секогаш запишани на етикетите на прехранбените производи, и тоа обично се специфични молекули (на пример, витамин А) или видови на молекули (на пример, протеини, липиди и сл.).

1.2.2 *Структура*

Структурната организација на состојките во храната игра голема улога во определувањето на физичко-хемиските својства, квалитетот и сензорните карактеристики на храната. Така на пример, два хранливи производи што имаат ист состав може да имаат многу различни карактеристики доколку нивните составни делови различно се организирани. Еве еден пример: доколку купите еден сладолед што е амбалажиран во картон од продавница, неговиот вкус е посебен и забележителен. Но, однесете го истиот

тој сладолед дома, стопете го и повторно замрзнете ја стопената маса. Вкусот на таквиот сладолед драстично се разликува од вкусот на оригиналниот сладолед земен директно од фрижидерот. И во двата случаи составот на двата сладоледи е идентичен, меѓутоа поради промените во структурната организација на конституентите предизвикани со топењето на сладоледот, доаѓа и до промена во квалитетот на тој производ. Белката од јајцето на пример е транспарентна кај свежо јајце. Меѓутоа, со загревање таа добива друга форма. Тоа е така поради процесите на денатурирање на протеините при загревање. И во двата случаи составот на белката од јајцето не се променил, но поради структурните промени, квалитетот и својствата на белката се комплетно различни.

Структурата на храната може да се анализира на повеќе начини:

- *Молекуларна структура* ($\sim 1\text{--}100\text{ nm}$). Вкупните физички и хемиски својства на храната зависат од типот на присутните молекули, нивната тродимензионална структура и интеракциите помеѓу состојките од храната. Поради тоа, потребно е научниците за храна да имаат соодветни аналитички техники со кои ќе може да ги проучуваат структурите и интеракциите на индивидуалните молекули од компонентите што се присутни во храната.
- *Микроскопска структура* ($\sim 10\text{ nm}\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$). Микроскопската структура на храната може да се набљудува микроскопски, и таа се состои од региони во храната каде што молекулите се асоцираат меѓу себе и формираат дискретни фази како што се капки од емулзија, масни кристали, протеински конгломерати и сл.
- *Макроскопска структура* ($\sim > 100\text{ }\mu\text{m}$). Ова е структурата што може да биде забележана со човечко око, на пример гранулати од шеќер, големи воздушни меури и сл.

Претходната дискусија ни покажа неколку различни нивоа во структурата што се битни за квалитетот и својствата на храната. Секоја од претходно наведените структури придонесува за вкупните својства на храната, како што се составот, стабилноста и вкусот. Со цел да бидат дизајнирани нови хранливи продукти или да се подобрат карактеристиките на постоечките хранливи продукти, потребно е да се знаат меѓусебните

релации помеѓу структурните и останатите својства во храната. За да бидат проучени тие релации, неопходна е употреба на аналитички техники. Во рамките на овој курс ќе бидат презентирани најбитните аналитички техники што се употребуваат во контролата на храна.

1.2.3. Физичко-хемиски својства

Физичко-хемиските својства на храната (реолошките својства, физичките својства, стабилноста, вкусот) го определуваат квалитетот на храната, сензорните карактеристики и однесувањето на храната за време на процесите на производство, складирањето и конзумирањето.

Оптичките својства на храната се определени од начинот на кој тие стапуваат во интеракција со електромагнетното зрачење во видливиот дел на спектарот. Такви својства се апсорпција на зрачење, рефлексија на зрачење и трансмисија на зрачење. Така на пример, полномасното млеко има многу поизразена бела боја отколку обезмастеното млеко. Тоа е така поради поголемата фракција од рефлектирана бела светлина од површината на полномасното млеко поради присуството на масни капки.

Реолошките својства на храната се определени од начинот на кој формата на храната се менува во зависност од видот на нанесената сила однадвор. Така на пример, маргаринот треба лесно да се размачкува кога ќе биде изваден од фрижидерот, но не смее да се топи самиот под дејство на сопствената тежина кога е оставен на масата.

Стабилноста на храната е мерка на нејзината способност да се спротивставува на промените на нејзините својства во текот на времето. Овие промени може да бидат од хемиска, физичка или биолошка природа. *Хемиската стабилност* се однесува на промените на природата на молекулите присутни во храната со текот на времето, како резултат на хемиски реакции, пример пероксидација на масните или неензиматско покафенување и сл. *Физичката стабилност* се однесува на промените во просторната застапеност на молекулите со текот на времето, односно на дистрибуцијата на одредени

молекули од едно на друго место во храната. *Биолошката стабилност* се однесува на промените на бројот на микроорганизми во храната со текот на времето.

Вкусот на храната е определен од начинот на кој определени молекули од храната стапуваат во интеракција со рецепторите во устата (вкус) или носот (мирис) на човекот. Вкусот на храната пред се^{“““} зависи од концентрацијата на состојките што го произведуваат вкусот, нивната природа во матриксот на храната, како и од подвижноста на молекулите на тие состојки од храната кон човечките сензори за вкус. Аналитички, вкусот се определува со мерење на концентрацијата на даден тип на супстанца во храната или во подрачјето непосредно над храната.

Според погоре кажаното, произлегува дека храната мора да биде дизајнирана на начин кој ќе овозможи да ги има бараните физичко-хемиски својства при дадени надворешни услови на кои храната ќе биде подложена во текот на процесот на производство, складирање и консумирање.

1.2.4. Сензорни својства на храната

Квалитетот на хранливите продукти е определен првенствено од интеракцијата на продуктите со сетилните органи на човекот. Од тие причини, сетилните својства на новите или на производите со подобрен квалитет најчесто се тестирани од луѓето за да утврдат дека производите имаат прифатливи и посакувани својства пред да бидат пласирани на пазарот.

Многу често, перцепцијата за сетилните карактеристики е доста субјективна и таа е зависна од многу фактори како што се: нутриционистичкото образование, тековните трендови, годините, здравјето, религијата и сл. За да се минимизираат овие фактори развиени се голем број на постапки со кои се добиваат релевантни статистички информации. Така на пример, производите од храна многу често се тестирани од страна на поголема група на потрошувачи што не се експерти. Притоа се определува нивната

реакција на некој нов производ пред истиот да биде комерцијализиран. Иако сетилната анализа најчесто е последен тест за прифаќање или одбивање на даден хранлив продукт постојат голем број на недостатоци кај овој вид на анализа. Така на пр. овие анализи се релативно скапи и одземаат доста долго време а многу често истите не се објективни.

Поради тоа, за утврдување на сетилните карактеристики се практикуваат аналитички анализи што се изведуваат во лаборатории кои што користат стандардизирани инструментации и процедури.

1.3. Избор на аналитичка техника

Постојат голем број на различни аналитички техники што се способни да определат дефинирано својство кај хранливите продукти. Поради тоа, неопходно е да се избере најсоодветната аналитичка техника за дадена специфична апликација. Изборот на аналитичката техника најчесто зависи од својството што треба да се мери, видот на храната што се анализира како и од причината поради која се врши анализата. Аналитичките постапки можат рутински да се изведуваат во лабораториите или во фирмите во кои што се врши контрола на храната, а можат да се извршуваат и во специфични лаборатории наменети за таа цел.

1.3.1. Литература

Генерално, постојат голем број на книги во кои што е даден детален преглед на голем број аналитички техники што се користат при анализата на храна и хранливи продукти. Дел од таа литература може да се најде во следниве референци:

Food Analysis, 2nd Edition. S.S. Nielsen, Aspen Publishers

Food Analysis: Theory and Practice. Y. Pomeranz & C.E. Meloan, Chapman and Hall

Food Analysis: Principles and Techniques. D.W. Gruenwedel and J.R. Whitaker, Marcel Dekker

Analytical Chemistry of Foods. C.S. James, Blackie Academic and Professional

1.3.2. Стручни списанија

Најголем број од аналитичките методи што се разработени за анализа на својствата на храната се публикуваат во специјализирани списанија како на пр: Journal of Food Science, Journal of Agriculture and Food Chemistry, Journal of the American Oil Chemists Society, Analytical Chemistry. Информации за дополнителни аналитички методи може да се најдат и со пребарување на определени бази на податоци кои постојат на (како на пр., Web of Science, Medline).

1.3.3. Интернет

Интернетот денес претставува извонреден извор на информации каде може да се најдат податоци за различни аналитички процедури што се користат при анализата на својствата на храната. Доколку не можете да најдете некоја специфична интернет страна, наједноставно е бараниот термин да го впишете во search прозорчето на www.google.com.

1.3.4. Разработка на нова техника

Многу често можно е да не постои соодветна техника за определување на својствата во дадена храна. Поради тоа, потребно е да се разработи нова аналитичка техника во сопствената лабораторија. При разработката на нови техники мора да се пријде со големо внимание за да бидеме сигурни дека новата техника ќе дава точни и веродостојни резултати. Тоа најчесто може да се утврди преку споредба на добиените резултати од новата техника со резултатите што би се добиле со примена на други етаблирани техники. Еден од најзначајните фактори на кој треба да се обрне внимание при разработката на нови аналитички техники е начинот на кој што анализот т.е. испитуваната компонента од храната ќе биде издвоен од компонентите што се наоѓаат во матриксот.

Најголем број од хранливите производи содржат голем број на различни состојки и често е потребно да се разработи метода што добро ќе го разликува анализот од другите компоненти што се наоѓаат околу него. Состојките во храната можат да се разликуваат

помеѓу себе по молекуларните својства, физичките својства и хемиските реакции. Во молекуларни својства спаѓаат: големина на молекулите, форма, поларност, електричен полнеж, интеракција со зрачење и сл. Во физики својства спаѓаат: густина, реологија, оптички својства, електрични својства, температура на топење, температура на вриење и сл. Во хемиските реакции се вбројуваат специфичните хемиски реакции помеѓу компонентата што е од интерес со даден хемиски реагенс. При разработката на соодветна аналитичка техника што е специфична за дадена компонента од храната, неопходно е да се идентификуваат молекуларните и физичко-хемиските својства на таа компонента што драстично ќе се разликуваат од соодветните својства на компонентите од матриксот. Во некои хранливи продукти возможно е директно да се определи аналитот во матриксот на храната но, кај голем број на храни потребно е да се направат голем број на подготвителни чекори со кои ќе се изолира аналитот пред да биде извршена анализата. Такви чекори најчесто се: екстракција, сушење, отстранување на некои компоненти и сл. Тоа се прави од причина што постојат супстанции кои имаат слични својства со аналитот. Овие така наречени интерференти многу често оневозможуваат да се разработи специфична аналитичка метода за посакуваниот аналит. Поради тоа, неопходно е отстранување на овие интерферентни супстанции пред да биде почната аналитичката постапка за определување на својствата на саканиот аналит.

1.4. Селектирање на соодветна техника

Некои од критериумите што се важни при селектирањето на соодветна аналитичка техника се:

Прецизност-претставува мерка за способноста за репродуцирање на инструменталниот одговор при определувањата направени од аналитичарот со употреба на истата инструментација и истата инструментална постапка.

Репродуцибилност-е мерка за способноста да се репродуцира еден инструментален одговор од аналитичари што работат со иста инструментација и иста експериментална постапка, но, во различни лаборатории.

Точност-е мерка за тоа колку блиску аналитичарот може да дојде до точната вредност на мереното својство.

Цена на чинење-вкупната цена на чинење на анализата што ги вклучува потрошените реагенси, употребената инструментација и приходите на работниците што ги изработуваат анализите.

Брзина-е времето што е неопходно за да се направат анализите на бараната компонента.

Сензитивност-е мерка за најниската концентрација на дадена компонента што може да се определи со дадена постапка.

Специфичност-е мерка за способноста да се детектира и квантифицира специфична компонента во присуство на други слични компоненти. Пр: определување на фруктоза во присуство на глукоза и сахароза и сл.

Безбедност-е мерка за употреба на реагенси што не се токсични или запаливи.

Природа на матриксот од храната-составот, структурата и физичките својства на компонентите што се содржат во матриксот на храната многу често влијаат на изборот на метод за анализа на даден аналит. Доколку постојат повеќе алтернативни методи за мерење на дадено својство на храната, тогаш изборот на дадена метода ќе зависи од тоа кој од горе наведените критериуми е најважен. Така на пример, многу често ќе се избере методата што дава најточни податоци а при некои анализи ќе се избере и најбрзата метода.

2. Земање на примероци и анализа на податоци

2.1 Вовед

Анализата на својствата на храната зависи од успешното комплетирање на повеќе различни чекори: планирање (определување на најсоодветната аналитичка постапка), избор на примерок, подготовка на примерок, изведување на аналитичката постапка, статистичка анализа на податоците и презентација на податоците. Сите овие сегменти ќе бидат подетално елаборирани во поглавјата што следат.

2.2. Селекција на примерок

Аналитичарите на храна многу често треба да ги определат својствата на голем број на хранливи продукти што се наоѓаат во различна фаза од производствениот процес.

За да се добие точна вредност на мерените својства што се од интерес, во идеален случај би требало да се анализира целокупниот материјал што стои на располагање. Но, со цел да се заштеди на време и материјал, нормално е да се избере репрезентативен примерок од целиот материјал за анализа и да се претпостави дека својствата на земиениот примерок ќе важат за целиот материјал. Селектирањето на соодветна фракција од целокупниот материјал е еден од најважните чекори при анализата на храната и тоа може да доведе до големи грешки доколку се изведе на несоодветен начин.

Популација, примерок и лабораториски примерок

На оваа место ќе дефинираме некои термини што треба да се употребуваат при карактеризацијата на храната чии својства треба да се анализираат.

Популација: со овој термин се дефинира целокупниот материјал чии својства треба да бидат анализирани.

Примерок: од популацијата ние земаме само една фракција за анализа. Таа фракција се нарекува-примерок.

Лабораториски примерок: делот од примерокот што е неопходен за експериментите во аналитичката постапка.

Примарна цел при селекцијата на примерок за анализа е да се обезбеди примерок чии својства ќе бидат репрезентативни за својствата на целокупната популација. За да се обезбеди репрезентативен примерок најчесто се анализираат повеќе лабораториски примероци и притоа се земаат средните вредности од измерените својства.

Планирање на земање примероци

Со цел да се осигураме дека лабораторискиот примерок земен за анализа ќе биде репрезентативен примерок за својствата на целокупната популација, неопходно е аналитичарот да направи план за земање на примерокот. Овој план треба да биде јасно напишан документ што содржи прецизни детали каде што аналитичарот ги опишува големината на примерокот, локацијата од каде примерокот е земен, методот што е употребен за собирање на примерокот како, и методите што се користени за чување на примерокот до неговата анализа. Изборот на планот за земање примерок зависи од целта на анализата, од својствата што треба да бидат мерени, од природата на популацијата, како и од типот на аналитичката техника што треба да се користи. Некои од најважните сегменти при изборот на план за земање примероци, се дискутирани во наредните секции.

2.2.1. Цел на анализата

Примарен сегмент при одлучувањето за соодветен план за земање примероци е целта на анализата. Примероците може да се анализираат поради различни причини и тоа влијае и врз видот на планот на земање примероци.

Официјални примероци-можат да бидат селектирани при официјални барања од владини лаборатории. Овие примероци се анализираат со цел да се провери дали производителите произведуваат храна со карактеристики и својства што се пропишани со легислатива. За ваквите анализи обично се применува пропишан аналитички протокол за земање на примероци за анализа.

Суровини-суровините најчесто се анализираат пред да бидат прифатени од фабриката за производство на храна, или пред да бидат употребени во даден процес на преработка. Целта на анализата на суровините е да се контролира дали тие го имаат бараниот квалитет.

Примероци земени во текот на процесот-многу често храната се анализира во текот на процесот на преработка со цел да се утврди дали процесот соодветно функционира. На тој начин, доколку се утврди некој проблем, можно е да се направат соодветни промени уште во текот на производствениот процес со цел да се добие производ со бараните квалитети.

Финални производи

Примероци од финалните производи често се земаат за анализа со цел да се провери дали храната е безбедна и дали ги исполнува пропишаните барања.

Природа на мерените својства

Откако ќе биде утврдена причината поради што се врши анализата на храната, неопходно е јасно да се специфицира даденото својство што ќе биде мерено, на пр: бојата, тежината, присуството на надворешни материи, содржината на масти, содржината на микроорганизми и сл. Својствата на храната можат да се класифицираат како: *постојани и променливи*.

Постојано својство е нешто што продуктот или го има или го нема. На пр. храната или содржи стакло и метални парчиња, или не содржи. Како варијабилни својства најчесто се оние што можат да бидат измерени како на пр. масата, содржината на масти или содржината на влага во материјалот. Природата на мереното својство ја определува сериозноста на мерениот резултат, доколку својствата на лабораторискиот примерок не се репрезентативни за целата популација. Така на пример, доколку мереното својство е присуство на штетни супстанции (бактерии, токсини и сл.), тогаш сериозноста во грешката при земањето на примерокот би била многу поголема отколку кога мереното својство би

било некој квалитативен параметар како што е бојата, составот и сл. Тоа значи дека планот за земање примерок мора да е многу поригорозен при детекција на потенцијално штетни супстанции, отколку при определување на квалитативни параметри.

Природа на популацијата

При одлучувањето за типот на планот за земање примерок што треба да биде употребен многу е важно јасно да се дефинира природата на популацијата од која што ќе бидат земени примероци. Некои од главните чекори се дадени подолу.

Популацијата може да биде конечна или бесконечна.

Конечна популација е онаа што има дефинирана големина, како на пр. камион со јаболки, контејнер со млеко и сл.

Бесконечна популација е онаа што нема дефинирана големина како на пр. подвижна лента што континуирано работи и од која периодично се зема храна за анализа. Анализата на конечната популација обично дава информации за својствата на популацијата додека при анализата на бесконечна популација се добиваат информации за карактеристиките на процесот.

Популацијата може да биде континуирана и сегментирана.

Континуирана популација е онаа каде не постои физичка сепарација помеѓу различните делови од примерокот. Пр. течно млеко што се чува во цистерна.

Сегментирана популација е онаа што може да биде поделена во повеќе сегменти, како на пр. кутии од чипс сместени во камион или шишиња со кечап што се движат по подвижна лента.

Популацијата може да биде хомогена или хетерогена.

Хомогена популација е онаа чии што својства на индивидуалните примероци се идентични на секоја локација од материјалот (пр. цистерна наполнета со добро промешано

масло), додека пак *хетерогена популација* е онаа во којашто својствата на поединечните примероци варираат со локацијата (камион полн со домати од кои некои се расипани). Во пракса најголем број од популациите се хетерогени па секогаш мора внимателно да се селектираат индивидуални примероци земени од различни локации на популацијата. На тој начин ќе добиеме релевантни информации за својствата на целокупната популација.

2.2.4 Природа на постапката за тестирање

Природата на постапката што се употребува за анализа на храната исто така може да влијае врз изборот на планот за земањето примерок за анализа. На пример, важни параметри при овој избор се брзината на анализата, точноста, прецизноста, трошоците, како и тоа дали техниката што се употребува е деструктивна или не.

2.2.5. Разработка на план за земање примерок

Откако ќе бидат земени во предвид горенаведените фактори, потребно е да се изработи план за земање примерок што ќе биде најсоодветен за бараната апликација.

Некои од карактеристиките што најчесто се специфицираат во официјалниот план за земање примероци се дадени во наредната дискусија.

Големина на примерокот. Големината на примерокот што се селектира за анализа зависи од очекуваните варијации на својството што треба да се мери во рамките на популацијата., од природата на крајниот резултат, од цената на чинење на анализата, како и од видот на аналитичката техника што ќе се применува за анализа. Така на пример, може да се разработи статистичка метода која ќе ни овозможи планирање на земањето примерок, со цел постапката да биде репрезентативна и веродостојна. Многу често, големината на примерокот е доста голема, и при ваквите случаи се користи метода на т.н. *секвенционално земање на примерок*. На овој начин, примероците селектирани од популацијата се испитуваат секвенционално се додека резултатите што се добиваат се погодни за статистичка обработка (да има добра повторливост и репродуцибилност во мерењата). Така на пример, примероците се анализираат се додека односот на добрите и

лошите својства не падне во дадена статистичка граница што ќе ни покаже дали дадената популација може да биде прифатена или одбиена.

Локација на примерокот. Кај хомогените популации не е важно од каде е земен примерокот за анализа, бидејќи сите примероци земени од било кое место на популацијата имаат исти својства. Кај хетерогените популации локацијата од каде што се земаат примероците е многу битен фактор. Така, при земањето на примероци по *случаен избор* примероците се бираат случајно од било која локација на популацијата што треба да биде анализирана. Овој начин на земање на примероци е доста згоден поради тоа што се избегнува субјективноста на човечкиот фактор што го прави земањето на примерокот. Тоа во голема мера го олеснува статистичкиот апарат што се применува при анализата на податоците. Во систематското земање на примерок, примероците се земаат систематски од дефинирана локација или при дефинирано време. Така на пример, може да се земаат за анализа примероци од секоја 10-та кутија во која се транспортираат производите, или пак примероци се земаат за анализа секои 60 секунди од подвижната лента по која се движат производите и сл. Овој начин на земање на примероци е многу лесен да се имплементира, меѓутоа многу е битно да бидеме сигурни дека при ваквиот начин не постои корелација помеѓу брзината на земање на примероците и својствата на земените примероци за анализа. Во т.н. *земање на примерок од експерт*, примероците за анализа ги зема аналитичар кој има големо искуство во својата работа и тоа го прави по своја проценка.

Многу често, кај овој тип на земање на примерок статистичкиот апарат може да биде неприменлив доколку аналитичарот не ги земе примероците на начин што би бил репрезентативен за целата популација.

Начин на селекција на примероци. Селектирањето на примероци за анализа може да се врши мануално или механички со посебни уреди наменети за таа функција. Начинот на кој се врши селектирањето на примероците обично е пропишан и дефиниран во планот за земање на примероци.

2.3 Подготовка на лабораториските примероци

Откако ќе го селектираме примерокот што треба да ги претставува својствата на целата популација, потоа мораме истиот примерок да го подготвиме за анализа во лабораторија. Подготовката на примерокот за анализа мора да се одвива на многу внимателен начин со цел да имаме прецизни и веродостојни резултати од експерименталните мерења.

2.3.1 Хомогенизирање на примерокот за анализа

Материјалот од храната внатре во *примерокот* што е селектиран од *популацијата* обично е хетероген, т.е. неговите својства варираат од една до друга локација.

Хетерогеноста внатре во примерокот за анализа може да биде предизвикана од варијациите во својствата на различните делови внатре во примерокот. Бидејќи хетерогеноста на примерокот би довела до својства што не би биле репрезентативни за целиот примерок, потребно е да се изврши хомогенизирање на примерокот пред тој да биде анализиран. Постојат голем број на механички алатки што се дизајнирани за хомогенизација на храна од најразличен вид и употребата на овие машини зависи пред се од природата на примерокот за анализа (дали примерокот е во течна или цврста агрегатна состојба). Хомогенизирањето, освен по механички пат може да се изврши и по хемиски или биолошки пат, со употреба на ензими, емулгатори, дисперзирачки супстанции, детергенти и сл.

2.3.2. Редуција на големината на примерокот

Откако примерокот ќе биде хомогенизиран, се селектира мала количина од таквиот хомогенизиран примерок за да биде анализиран. Тој фрагмент од примерокот што е одбран да биде анализиран се нарекува *лабораториски примерок*. Во идеален случај, лабораторискиот примерок треба да има својства што ќе бидат репрезентативни за целата популација. Плановите за земање примерок многу често подразбираат и методи за

намалување на големината на примерокот со цел да се добијат веродостојни и повторливи резултати.

2.3.3. Превенција на примерокот од промени

Откако примерокот за анализа ќе биде селектиран, мораме да бидеме сигурни дека неговите својства нема да претрпат значителни промени од моментот на земањето на примерокот до моментот на почетокот на хемиската или микробиолошката анализа.

Постојат голем број на начини на кој овие промени во својствата на примерокот може да бидат спречени.

Ензиматска деактивација. Голем број на хранливи производи содржат активни ензими што можат да предизвикаат промени во својствата на храната. Такви се на пример: протеазите, целулазите, липазите и слични други ензими. Доколку некој од овие ензими е активен и може да предизвика промена во својствата на примерокот земен за анализа, тоа ќе доведе до грешни податоци при постапката на анализа. Тоа значи дека активноста на присутните ензими во храната треба да биде намалена или елиминирана. Замрзнувањето, сушењето, термичкиот третман, употребата на хемиски конзерванси, или комбинација на овие техники се најчесто применуваните методи за контрола на активноста на ензимите.

Заштита на липидите. Својствата на незаситените масни киселини во составот на липидите може да бидат променети со различни реакции на оксидација. Изложеноста на светлина, зголемените температури и присуството на кислород или оксиданти (рекативни честички на кислородот) најчесто доведуваат до забрзување на брзината на оксидација на липидите. Со цел да се спречи појавата на оксидација на липидите, потребно е да се изврши соодветно складирање на примероците што во својот состав содржат поголема количина на незаситени масни киселини. Најчесто ваквите примероци се чуваат во атмосфера на азот или на некој друг инертен гас, и истите се складираат во мрачни простории и на ладни места. Многу често во ваквите примероци се додаваат и антиоксиданти, односно супстанции што ја спречуваат оксидацијата на липидите.

Микробиолошко загадување. Микроорганизмите обично се присутни во голем број на хранливи продукти, и доколку нивната концентрација не се контролира на стриктен начин, може да предизвикаат промена на составот на храната. Ладењето, сушењето, термичкиот и хемискиот третман на примероците за анализа се најчесто употребувани методи за да се спречи растењето и размножувањето на микроорганизмите присутни во примероците за анализа.

Физички промени. Во примероците што се земаат за анализа може да се случат голем број на физички промени како што се губење на вода, кристализација на вода и сл. што може да доведе до промени во структурата на примерокот. Физичките промени може да се минимизираат најчесто преку контрола на температурата на која што се чува примерокот.

2.3.4. Идентификација на примерокот

Лабораториските примероци за анализа секогаш мора да бидат внимателно означени и обележани. На тој начин, доколку се појави некој проблем од било каква природа, потеклото на тој проблем може релативно лесно да биде детектирано.

Информациите што се користат за идентификација на примероците се:

- а) опис на примерокот
- б) времето кога е земен примерокот
- в) локацијата од која што е земен примерокот
- г) име на лицето што го зело примерокот
- д) методот што е користен за селектирање на примерокот.

Аналитичарот секогаш треба да си води забелешки во својот лабораториски дневник, каде што јасно ќе ги забележува и документира методите за селекција на примерокот за анализа и постапките применети за подготовка на примерокот за анализа.

Секој примерок за анализа треба да биде означен со код или *баркод* на неговата етикета и истиот тој код мора да стои и во дневникот на аналитичарот. Така, доколку се појават некои проблеми истите може лесно да бидат идентификувани.

2.4. *Анализа на податоците*

При анализата на храна обично се прават поголем број на мерења врз селектираниот примерок за анализа и истите се повторуваат неколку пати. Тоа се прави за да се обезбеди веродостојност на добиените резултати на мерените својства. Постојат голем број на статистички методи што се користат за обработка на добиените податоци од повеќекратните анализи на примероците за анализа.

2.4.1. *Мерка за централната тенденција на податоците*

Статистичкиот параметар што најчесто се употребува за опишување на сите својства добиени од повеќе експериментални мерења е *средната вредност*:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1)$$

овде n е вкупниот број на мерењата, x_i се индивидуалните измерени величини на својството што се мери а \bar{x} е симбол за средната вредност.

Средната вредност е *најдобрата експериментална пресметка* за вистинската вредност на мереното својство што може да се определи од мерењата. Средната вредност не мора да кореспондира со вистинската вредност на мереното својство. Тоа е така поради систематски грешки што секогаш се појавуваат при процесот, и тие доведуваат до тоа да не можеме со точност да ја измериме вистинската вредност на бараното својство.

Прецизността се однесува на тоа колку мерените вредности на бараното својство се блиску до *вистинската* вредност на тоа својство. Проблемот со определувањето на прецизността лежи во тоа што вистинската вредност на мереното својство во голем број

случаи не е позната. За да се надмине овој проблем, најчесто се купуваат и употребуваат стандарди со познати својства. Притоа, овие стандарди се анализираат на ист начин како и храната што е предмет на испитување. Апсолутната грешка E_{abs} , што е дефинирана како разлика помеѓу вистинската (x_{true}) и измерената вредност на мереното својство (x_i), може да се определи од следниот израз: $E_{abs} = (x_i - x_{true})$. Поради овие причини, аналитичките инструменти што се употребуваат за анализа на храната мора да бидат внимателно одржувани и калибрирани со цел да се обезбеди дека тие прописно функционираат и даваат веродостојни резултати од мерењата.

2.4.2. Мерка за расејувањето на податоците

Расејувањето на податоците е мерка за тоа колку близу еден до друг се податоците од последователните мерења на мереното својство. Најчесто, мерка за расејувањето на податоците од последователните мерења е *стандардната девијација SD*.

Стандардната девијација определена за сет од последователни мерења е дадена со следната равенка:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Друг параметар што често се употребува за да ни даде информации за релативното расејување на податоците околу средната вредност е *коефициентот на корелација CV*, дефиниран со следниот израз $CV = [SD / \bar{x}] \times 100\%$.

2.4.3. Извори на грешки

Најчесто постојат три извори на грешки во секоја аналитичка техника:

Персонални грешки. Овие грешки се случуваат кога даден аналитички тест не се спроведува коректно: можно е да се употребуваат погрешни хемиски реагенси или погрешна инструментација, можно е да има грешки во пресметките кај волуменот и

масата, можно е примерокот земен за анализа да претрпел промени и сл. Поради овие причини, потребно е мерењата да се вршат повеќе пати и тоа на свежо припремани лабораториски примероци. Овие грешки најчесто брзо се забележуваат и може да се избегнат со повторување на постапката за анализа од почеток.

Случајни грешки. Овие грешки произведуваат податоци што може да варираат во нелогичен ред од едно до друго мерење. Овој тип на грешки ја определува и стандардната девијација од мерењата. Постојат голем број на вакви грешки и тие се дадени во поглавјето “Пропагација на грешките” во понатамошниот дел од скриптата.

Систематски грешки. Систематските грешки продуцираат резултати што конзистентно се разликуваат од вистинските вредности на мереното својство. Овие грешки се случуваат на пример кога пипетираме и кога волуменот на употребената пипета е различен од тој што стои на етикетата. 100 cm^3 , да речеме дека при пипетирање секогаш земаме 101 cm^3 . На тој начин правиме систематска грешка земајќи поголем волумен за анализа.

За да направиме точни и прецизни мерења, неопходно е при разработката на метода за анализа да се идентификуваат можните извори на грешки и истите да бидат минимизирани. Најчесто потребно е да се идентификува изворот на најголема грешка во секој поодделен чекор од постапката и да се отстрани тој извор на грешка.

2.4.4. Пропагација на грешките при анализата на храна

Кај најголем дел од аналитичките процедури што се употребуваат при анализата на храна постојат голем број на постапки (пр. вагање, мерење на волумен, и сл.), така што секогаш постои веројатност за грешки поврзани со секој чекор во постапката. Овие индивидуални грешки ја определуваат и големината на крајната целокупна грешка во крајниот резултат. За случајните грешки постојат голем број на едноставни правила од кои може да се пресмета грешката во крајниот резултат:

Собирање ($Z = X+Y$) и одземање ($Z = X-Y$):
$$\Delta Z = \sqrt{\Delta X^2 + \Delta Y^2} \quad (3)$$

$$\frac{\Delta Z}{Z} = \sqrt{\left(\frac{\Delta X}{X}\right)^2 + \left(\frac{\Delta Y}{Y}\right)^2} \quad (4)$$

Множење ($Z = XY$) и делење ($Z = X/Y$):

Во горниот израз, ΔX е стандардната девијација од средната вредност X , ΔY е стандардна девијација на средната вредност од Y , и ΔZ е стандардната девијација од средната вредност од Z . Овие едноставни правила треба да се научат и да се употребуваат кога се пресметува вкупната грешка во крајниот резултат.

Да претпоставиме еден практичен пример каде сакаме да ја определиме содржината на МАСТИ во храна. Да претпоставиме дека сме ја измериле масата на екстрахирани масти од храната (M_E) и иницијалната (почетната) маса на храната (M_I):

$$M_E = 3.1 \pm 0.3 \text{ g}$$

$$M_I = 10.5 \pm 0.7 \text{ g}$$

$$\% \text{ масти} = 100 \times M_E / M_I$$

За да ја пресметаме средната вредност и стандардната девијација на содржината на масти во храната, треба да го употребиме правилото дадено со равенката 4, т.е. ($Z=X/Y$).

На почеток препишуваме бројни вредности на различните параметри во соодветниот израз за пропација на грешката:

$$X = 3.1; \Delta X = 0.3$$

$$Y = 10.5; \Delta Y = 0.7$$

$$\% \text{ масти} = Z = 100 \times X/Y = 100 \times 3.1/10.5 = 29.5\%$$

$$\Delta Z = Z \sqrt{[(\Delta X/X)^2 + (\Delta Y/Y)^2]} = 29.5\% \sqrt{[(0.3/3.1)^2 + (0.7/10.5)^2]} = 3.5\%$$

На овој начин, содржината на масти во храната ќе биде $29.5 \pm 3.5\%$.

2.4.5. Значајни цифри и заокружување

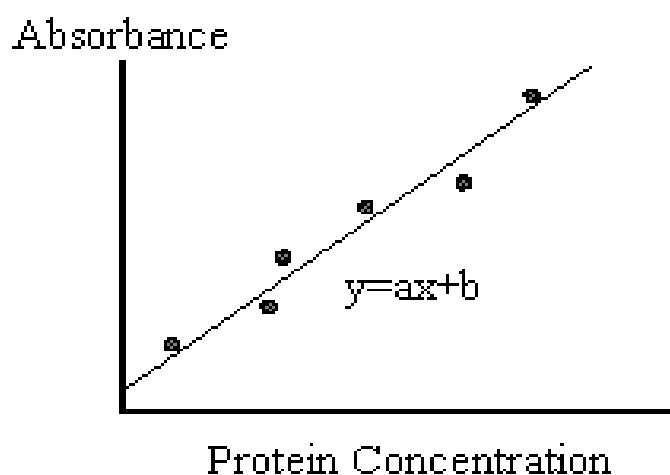
Бројот на значајни цифри при прикажувањето на крајниот резултат зависи од стандардната девијација од мерењата. Крајниот резултат од мереното својство се прикажува со толку цифри за колку што се знае дека се точни заедно со последната цифра за која се знае дека не е точна. Така на пример, доколку претставиме некој резултат со бројна вредност од 12.13, тогаш знаеме дека бројот со цифрите 12.1 е точен, но последната цифра 3 од бројот 12.13 е несигурна, и таа би можела да биде или 2 или 4.

Кај операциите на множење ($Z = X \times Y$) и делење ($Z = X/Y$), значајните цифри во крајниот резултат (Z) треба да бидат еднакви со значајните цифри со бројот кој што има најмалку значајни цифри од броевите од кои крајниот резултат е добиен. Пример, 12.312 (5 значајни цифри) \times 31.1 (3 значајни цифри) = 383 (3 значајни цифри). Кај операциите на собирање ($Z = X + Y$) и одземање ($Z = X - Y$), бројот на значајни цифри во крајниот резултат (Z) е определен од бројот од кој што бројната вредност на Z е добиена (X или Y) кој има помалку значајни цифри после децималната запирка. Така на пример, 123.4567 (последната значајна цифра е во "0.0001" децимална колона) + 0.31 (последната значајна цифра е во "0.01" децималната колона) = 123.77 (последната цифра е во "0.01" децималната колона). При заокружувањето на броевите, важи правилото дека кога последната значајна цифра после децималната запирка е помала од 5, тогаш таа цифра се заокружува на „0,,, додека кога таа цифра е „5,, или поголема од 5, тогаш се заокружува на следен цел број. Пример 23.453 ќе биде 23.45; 23.455 ќе биде 23.46; 23.458 ќе биде 23.46.

2.4.6. Стандардни криви: Регресиона анализа

При изведувањето на дадена аналитичка процедура за анализа на храната, неопходно е да се подготват т.н. „стандардни криви,, што помагаат да се определи дадено својство на некој непознат материјал. Овие стандардни криви се конструираат со мерење на својствата на стандарди со позната концентрација, и со прикажување на големината на мереното својство во зависност од концентрацијата или масата на употребените стандарди. Така на пример, може да се мерат серија на идентични протеини со различна

концентрација при што се добиваат податоци за апсорбцијата на електромагнетното зрачење што поминува низ тие стандардни раствори од протеините. Тоа може да се направи со примена на UV-видлив спектрофотометар. За раствори на протеини со ниска (микро или милимоларна) концентрација постои линеарна зависност помеѓу вредноста на апсорбанцата A и концентрацијата на протеините како што е прикажано на сликата:



Линијата што најдобро се вклопува при поврзувањето на сите точки добиени од мерењата се добива со т.н. регресиона анализа. Правата добиена на ваков начин има нагиб дефиниран како „ a „ и отсечок на y -оската дефиниран како „ b „. И „ a „ и „ b „ се во суштина некои бројни вредности што ги добиваме од програмот што го користиме при регресионата анализа. Така, доколку ги знаеме вредностите на нагибот и отсечокот, кога вредноста на мереното својство „ y “ (апсорбанцата во нашиот случај) на примерокот со непозната концентрација на протеин ќе ја измериме експериментално, тогаш концентрацијата (масата) на непознатиот протеин можеме да ја добиеме употребувајќи го изразот: $x = (y-b)/a$, каде x е означена концентрацијата на протеинот, а со y е означена апсорбанцата, додека „ a „ и „ b „ се вредностите на нагибот и отсечокот добиени од стандардната крива. Податок за тоа колку добро правата линија е во согласност со експерименталните податоци ни дава коефициентот на корелација r^2 , кој има вредности

понеѓу 0 и 1. Колку вредноста на r^2 е поблиску до 1, толку фитувањето на правата линија со експерименталните точки е подобро и обратно. Кога $r^2 = 1$ тогаш имаме идеално фитување. Сите комерцијални математички компјутерски програми имаат сопствен апарат од кој вредностите на нагибот, отсечокот и коефициентот на корелација се добиваат на многу едноставен начин.

2.4.7. Отфрлање на вредности

При изведувањето на експерименталните аналитички постапки често се појавува случај во кој една мерена точка драстично се разликува од останатите измерени точки. Тоа е резултат на одреден погрешен чекор при аналитичката постапка. Најчесто ваквите нелогични вредности се третираат како неточни и тие се отфрлаат. Постои математичка постапка која што може да ни каже дали една измерена вредност може да биде отфрлена или не. Тестот што се применува при вакви случаи се нарекува *Q-test*:

$$Q = \frac{X_{BAD} - X_{NEXT}}{X_{HIGH} - X_{LOW}}$$

Со X_{BAD} е означена вредноста што е сомнителна, X_{NEXT} е следната вредност што е најблиска до сомнителната вредност X_{BAD} , X_{HIGH} е највисоката измерена вредност, додека X_{LOW} е најниската измерена вредност. Доколку вредноста на Q е поголема отколку вредноста дадена во табелата за *Q-test* за бројот на примероци што се анализирани, тогаш сомнителната вредност може да биде отфрлена:

Број на мерења	Q-вредност за отфрлање на мерената вредност (90% ниво на веродостојност)
3	0.94
4	0.76
5	0.64
6	0.56
7	0.51
8	0.47
9	0.44

Пример, доколку имаме направено 5 мерења и притоа едно мерење било многу различно од другите (пр, 20, 22, 25, 50, 21), и ако пресметаме (според дадената формула) дека Q-вредноста од овие мерења е 0.84, тогаш сомнителната вредност може да биде отфрлена, бидејќи пресметаната Q-вредност е поголема од 0.64, т.е. од Q-вредноста што е предвидена во Q-test табелата за пет мерења.

3. *Определување на влага и на вкупна цврста материја*

3.1 *Вовед*

Содржината на влага е една од најчесто мерените својства на храната и хранливите производи. Таа е битна за научниците што се занимаваат со испитување на својствата и квалитетот на храната од различни причини и тоа:

- *Официјални барања и прописи.* Постојат официјално пропишани граници за минималното и максималното количество на вода што треба да биде присутна во даден тип на храна.
- *Економски причини.* Цената на чинење на голем број хранливи производи зависи од содржината на присутната вода во истите. Имено, водата е многу евтина суровина и производителите се обидуваат во хранливите производи да стават што е можно повеќе вода, но не надминувајќи ги притоа официјалните прописи и барања.
- *Микробиолошка стабилност.* Способноста на микроорганизмите да се размножуваат во голема мерка зависи од содржината на вода во храната. Од тие причини, голем број на хранливи производи се сушат до ситуација во која би содржеле минимална концентрација на вода во себе.
- *Квалитет на храната.* Квалитетот, вкусот, составот и стабилноста на голем број на хранливи производи зависи во голема мера од содржината на вода во нив.
- *Операциите на преработка на храната.* Податоците за содржина на водата многу често се неопходни за да се определи однесувањето на храната при процесите како што се мешање, сушење, течењето низ цевки, пакување и сл.

Поради горенаведените причини, неопходно е да се има веродостојна и релевантна метода за точно определување на водата (влагата) во храната. За таа намена разработени се голем број на аналитички техники, и сите тие се разликуваат според цената на чинење, брзината на изведување на анализите, специфичноста, сензитивноста, едноставноста во

водењето на анализата и сл. Изборот на аналитичката техника за мерење на содржината на вода во храната зависи првенствено од природата на храната што треба да се анализира.

3.2 Својства на водата во храната

Содржината на влага во хранливите материјали се дефинира со следниот израз:

$$\% \text{Moisture} = (m_w / m_{\text{sample}}) \times 100$$

каде m_w е масата на водата, додека со m_{sample} е означена масата на примерокот земен за анализа. Масата на водата е во тесна врска со бројот на молекулите на вода преку следната релација: $m_w = n_w M_w / N_A$, каде M_w е моларната маса на водата (18.0 g/mol) а N_A е Авадгро-вата константа (6.02×10^{23} молекули/mol). Според тоа, содржината на влага во храната може да се определи релативно прецизно преку мерење на масата на молекулите на вода што се присутни во позната маса од примерокот земен за анализа. Разработени се голем број на аналитички техники за определување на содржината на влага во храната што се базирани на определување на масата на вода во дадена маса на примерок од храна. И покрај тоа што изгледа дека определувањето на вода е доста лесна и тривијална задача, кај скоро сите аналитички методи развиени за оваа намена постојат проблеми и лимитирања во поглед на точното определување на содржината на влага што произлегуваат од различни причини. Од тие причини, развиени се дополнителни аналитички методи за мерење на влагата што не се засноваат на директно мерење на масата на водата во храната.

Овие техники функционираат на принципите дека водата во храната може да се разликува од другите компоненти во храната преку различни мерливи параметри.

Разработката на аналитички методи за определување на водата во храната пред сЕ%%% зависи од познавањето на својствата на водата. Молекулата на вода е изградена од водород и кислород што се поврзани со ковалентна врска (H_2O). Секој од двата атоми на водород има мал парцијален позитивен полнеж (δ^+) на својата структура, додека атомот на кислород има мал негативен полнеж (δ^-). Овој феномен овозможува молекулите од

вода помеѓу себе да бидат поврзани преку водородни врски ($\text{O}-\text{H}^{\delta+} \leftrightarrow \delta^-\text{O}$) со други четири соседни молекули на вода. Силата и ориентацијата на овие водородни врски се во суштина причина за големиот број единствени физички и хемиски својства на водата. Разработката на аналитички методи за определување на содржината на влага зависи првенствено од тоа како можеме да ја разликуваме водата ("аналитот") од останатите состојки и компоненти присутни во храната ("матриксот"). Својствата на водата најчесто се параметри што овозможуваат да се обезбедат вакви услови. Имено, водата има релативно ниска температура на вриење, има голема поларност и има способност да реагира со специфични хемиски реагенси. Покрај тоа, има специфични својства да го апсорбира електромагнетното зрачење, а има и доста специфични физички својства (густина, компресибилност, електрична спроводливост и индекс на рефрактивност).

Иако имаат иста хемиска формула (H_2O), молекулите на вода во храната може да бидат присутни во различна околина, во зависност од интеракциите на молекулите од вода со молекулите на други супстанции што се наоѓаат непосредно до молекулите на вода во храната. Во зависност од различната околина, својствата на вода присутна во храна, што има различен состав, се различни.

- *Чиста вода.* Оваа вода е ослободена од други компоненти, и во неа секоја молекула на вода е во соседство само на други молекули од вода. Тоа значи дека физичките и хемиските својства на ваквата вода се идентични по целиот состав и во секој дел од просторот.
- *Капиларна или заробена вода.* Капиларната вода обично се наоѓа во тесни канали помеѓу компонентите од храната. Заробената вода пак се наоѓа во некој простор во храната што е ограден со бариери преку кои водата не може да помине. Таков пример се капките од емулзија или биолошките мембрани. Ваквата вода обично има физички и хемиски својства што се слични на тие од чистата вода.
- *Физички сврзана вода.* Голема фракција на молекули од вода присутни во храната не се целосно обиколени со други молекули на вода, туку се во контакт со други компоненти присутни во храната, како што се протеините, јаглехидратите,

минералите и сл. Врските помеѓу молекулите на вода и молекулите на споменатите компоненти многу често се разликуваат во голема мерка од нормалните интеркации помеѓу истоимените молекули од вода. Тоа придонесува ваквата вода да има различни физички својства од чистата вода, т.е. различна точка на топење и испарување, различна густина, различен топлински капацитет и сл.

- *Хемиски сврзана вода.* Некои од молекулите на вода присутни во храната може да бидат сврзани во структурата на други молекули од храната во форма на т.н. кристалохидрати, пример $\text{NaSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Овие врски во кристалохидратите се многу посилни одошто нормалните врски помеѓу молекулите од вода, така што оваа вода присутна во кристалохидратите има различни својства од чистата вода, како на пример: пониска точка на топење, повисока точка на вриење, поголема густина и сл.

Бидејќи храната содржи вода што може да се најде во различна хемиска околина и да има различни физички и хемиски својства од тие на чистата вода, ова обично претставува проблем при апликацијата на техниките за мерењето на водата во храната. Во зависност од тоа каков тип на вода сме заинтересирани да определиме (вкупна вода, вода заробена во капилари, хемиски сврзана вода или вода што е во околина на други специфични молекули) ќе одбереме соодветна аналитичка техника што ќе биде најсоодветна за бараниот избор на анализа на водата.

3.3. Подготовка на примерок

Изборот на репрезентативен примерок треба да обезбеди заштита од промени во својствата на примерокот во периодот од неговото земање до почетокот на анализата. При определувањето на влага во храната, важно е да се спречи секое дополнително губење или добивање на влага од и во примерокот од храна што е земен за анализа. Од тие причини, потребно е да се минимизира изложувањето на примерокот на големи температурни флукуации. Кога примероците за анализа се складираат во контејнери, обично се практикува целиот контејнер да се наполни до максимум. На овој начин се спречува да

дојде до промена на температурата, а со тоа и до промена на содржината на влага во неговиот состав. Најважните техники што се применуваат за определување на содржината на влага се дискутирани во наредните секции.

3.4. Методи на испарување

3.4.1. Принципи

Овие методи се засноваат на мерење на масата на водата во позната маса на примерок земен за анализа. Содржината на влага се определува со мерење на масата на примерокот на храна пред и после отстранувањето на водата од примерокот:

$$\% \text{Moisture} = \frac{M_{\text{INITIAL}} - M_{\text{DRIED}}}{M_{\text{INITIAL}}} \times 100$$

Во горниот израз, со M_{INITIAL} и M_{DRIED} се означени масите на примерокот пред и после сушењето, соодветно. Основните принципи на овие техники се темелат на фактот дека водата има пониска температура на испарување од температурите на испарување на другите компоненти во храната како липидите, протеините, јагленхидратите и минералите.

Многу често, наместо содржината на влага се употребува и параметар познат како *вкупна количина на цврста материја (total solids)*, како мерка за определување на содржината на влага во храната. Вкупната количина на цврста материја е мерка за вкупната маса на материјал преостанат откако целата вода од примерокот е испарена. Овој параметар се дефинира на следниот начин:

$$\% \text{Total Solids} = \frac{M_{\text{DRIED}}}{M_{\text{INITIAL}}} \times 100$$

На тој начин, $\% \text{Total solids} = (100 - \% \text{ влага})$.

За да се добијаат прецизни мерења за содржината на цврсти материи во храната неопходно е да се отстрани вкупната содржина на вода од примерокот на храна земен за анализа, без да се промени со тоа масата на матриксот. Ова е многупати тешко да се направи во пракса, бидејќи високите температури или пак продолженото време на сушење обично доведуваат и до промени во масата на матриксот, односно полесно-испарливите компоненти од матриксот секогаш може да испарат заедно со водата. Поради овие причини, условите за сушење на храната секогаш се стандардизирани во поглед на температурата и на времето на сушењето. Доколку се употребува стандарден метод за подготовка на примерокот за анализа и стандарден метод на анализа, секогаш ќе има минимизирање на изворите на грешки при овие методи.

3.4.2. Уреди за испарување

Топлинската енергија што се употребува да се испари водата од примерокот на храна земен за анализа може да биде донесена директно (печка) или индиректно (преку радијација која ќе доведе до апсорпција на енергија од страна на молекулите на вода присутни во примерокот земен за анализа).

Воздушни печки. Точно измерени примероци за анализа се ставаат во печка на дефинирана температура и при дефинирано време (пр. 3 часа на 100 °C) и потоа се определува нивната маса после сушењето, или пак тие се сушат до константна маса.

Топлинската енергија што се употребува за да се испари водата директно се носи на примерокот од храна земен за анализа. Поради температурните разлики што може да се јават на различни места во печките, најчесто се употребуваат печки со проточен воздух, во кои секогаш има проток на воздух кој циркулира во печката и ја отстранува влагата од системот.

Вакуум печки. Точно измерени примероци на храна за анализа се ставаат во вакуум печка што работи под намален притисок (обично при 25-100 mm Hg) при специфицирана температура, при што се определува нивната маса после сушењето. И кај овие печки,

топлинската енергија што се употребува за отстранување на водата од примерокот директно се носи на примерокот од храна земен за анализа. Кај овие печки најчесто постои отвор за влез и излез на воздух што ја носи испуштената водена пареа надвор од печката. Кај овие печки сушењето може да се одвива на пониски температури (пр. 70°C наместо 100 °C), со што се заштедува енергија и се оневозможува на компоненти од матриксот да испарат заедно со водата.

Микробранова печка. Точно измерени примероци на храна за анализа се ставаат во микробранова печка при специфично време и специфична моќност (фреквенција) на печката, при што на крај се мери масата на сувиот остаток. Молекулите на вода од храната испаруваат затоа што тие можат да апсорбираат микробранова енергија. Со апсорбирање на оваа енергија, молекулите на вода термално се ексцитираат и испаруваат. Предностите на микробрановите печки во однос на другите печки е што тие се лесни за ракување и многу брзи.

Сушење со инфрацрвена ламба. Точно измерени примероци на храна за анализа се ставаат под инфрацрвена ламба, и масата на примерокот се мери како функција од времето. Бидејќи молекулите на вода присутни во храната апсорбираат инфрацрвена енергија, тие се ексцитираат и испаруваат. Најголема предност на овој метод на испарување е тоа што трае многу кратко, 10-25 минути, а целата инструментација е доста евтина. За да се добијат репродуцибилни мерења, потребно е добро да се контролира растојанието на инфрацрвената ламба до примерокот за анализа. Овие методи со инфрацрвена светлина не се официјално признати методи во многу земји, бидејќи е тешко да се стандардизира процедурата. Сепак истите често се употребуваат.

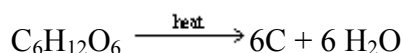
3.4.3. Практични забелешки

1. *Димензии на примерокот за анализа.* Брзината и количината на отстранување на влага од даден примерок на храна зависи од големината и формата на примерокот,

и од степенот на иситнетост. Колку е поголема допирната површина на материјалот што се суши, толку е побрзо отстранувањето на влагата.

2. *Лепење и формирање на површинска обвивка.* Голем број на примероци од храна имаат тенденција да се лепат заедно или да формираат полу-пропустлива обвивка за време на процесот на сушење. Тоа може да доведе до погрешни и нерепродуцибилни резултати затоа што губењето на водата е оневозможено или отежнато. Од тие причини, примероците на храна најчесто се мешаат со исушена земја со цел да се спречат процесите на лепење и формирање на обвивка.
3. *Зголемување на температурата на вриење.* При нормални услови, чистата вода врие на $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. меѓутоа, доколку во водата се присутни растворени материи, тогаш нејзината температура на вриење се покачува. Причина за тоа е намалувањето на парниот притисок на водата, па поголема енергија е потребна за да испарат молекулите на вода во присуство на други растворени молекули. Соодветно, губењето на влагата од вакви примероци е отежнато. Температурата на вриење на водата (T_b) што содржи некои растворени материи е дадена со изразот $T_b = T_0 + 0.51m$, каде што T_0 е температурата на вриење на чистата вода, а со m е означен молалитетот на растворената супстанца во растворувачот (mol/kg молекули на растворена супстанца на килограм од растворувач).
4. *Тип на вода.* Едноставноста со која водата се отстранува од примерок на храна земен за анализа зависи од интеракциите на водата со молекулите на другите компоненти присутни во храната. Слободната вода најлесно може да биде отстранета од примерокот со испарување, додека многу поинакви услови се потребни за испарување на хемиски или физички сврзаната вода. Ваквите дополнителни услови може да предизвикаат деградација и декомпозиција на другите компоненти присутни во храната и да придонесат за погрешни резултати кај другите материи што се анализираат..
5. *Декомпозиција на другите компоненти во храната при процесот на сушење.* Доколку температурата на испарување е премногу висока, или пак сушењето се изведува премногу долго, тогаш е можно да дојде до декомпозиција на некои

термолабилни состојки што се присутни во храната. Тоа ќе предизвика промени во составот на матриксот од храната и ќе доведе до погрешни резултати за повеќе анализирани параметри. Поради тоа, потребно е да се употребуваат компромисни температури и компромисно време при процесите на сушење, што се доволни за отстранување на целокупната влага, но не се премногу големи за да предизвикаат значителна термална декомпозиција на матриксот. Еден пример за декомпозиција што интерферира со содржината на влага е примерот за јаглехидратите (гликозата $C_6H_{12}O_6$ во примерот даден подолу).



Водата што се ослободува при овој процес на декомпозиција на гликозата при повисоки температури не е водата што ние се обидуваме да ја измериме.

Ваквиот процес ќе доведе до повисоки резултати за содржината на вода во примерокот што се анализира. Од друга страна, голем број на хемиски реакции што се случуваат при повисоки температури може да доведат до апсорпција на водата. Пример е реакцијата на хидролиза на сахарозата $\text{сахароза} + H_2O \xrightarrow{\text{heat}} \text{фруктоза} + \text{гликоза}$. Тоа ќе доведе до мерење на намалена содржина на влага во примерокот храна што се анализира. Влагата во храната што е премногу осетлива на термална декомпозиција најчесто се определува со хемиски или физички методи, а не со методите на сушење.

6. *Испарување на други компоненти од храната.* Многу често се претпоставува дека губитокот на маса при процесите на сушење е само поради губењето на водата од примерокот. Во пракса, храната содржи и голем број на други лесно испарливи материи кои што лесно може да бидат испарени во текот на процесот на сушење (супстанции што го даваат мирисот и вкусот, некои киселини и сл). Доколку храната содржи поголема концентрација на вакви супстанции (билки, зачини), тогаш влагата

во неа треба да се определува со алтернативни методи како хемиски или физички методи, но не со процес на сушење и испарување.

7. *Примероци со висока содржина на влага.* Примероците на храна што содржат големи количини на влага најчесто се сушат во два сегменти, при што се применува процес на распрскување. Тоа се прави со цел атмосферата во печката за сушење да не се засити со испарената вода од примерокот, па потоа таа вода пак да биде апсорбирана во примерокот. Распрскувањето е процес при кој одредена количина на вода во храната излегува надвор од храната, носејќи и други состојки од храната во неа. Така на пример, голема содржина на вода од млекото се отстранува со загревање на бања пред истата да биде целосно отстранета во печка за сушење.
8. *Температура и ниво на моќност на инструментите.* Со цел да не дојде до варирање на температурата во текот на процесите на сушење, потребно е температурата плански и автоматски да се контролира. Ова важи и за параметрите на моќност кај методите што не користат температура за сушење на водата од примероците.
9. *Садови за сместување на примероците за анализа.* Кога се прави анализа на вода во храната, потребно е да се употребуваат соодветни садови за чување на примероците. Најчесто се употребуваат алуминиумски садови, бидејќи истите се ефтини и имаат добра топлинска спроводливост. Овие садови пред употребата треба да се сушат во печка, и да се остават да стојат во ексикатор пред да бидат употребени за анализа на примероците. Тоа се прави со цел од нив да се отстрани целокупната содржина на влага пред почетокот на анализата на примероците од храна.

3.4.4. Предности и недостатоци

Предности: Прецизни, релативно ефтини, едноставни за ракување, повеќе примероци може да се работат симултано.

Недостатоци: Деструктивни методи, несоодветни за сите типови на храна, траат долго време;

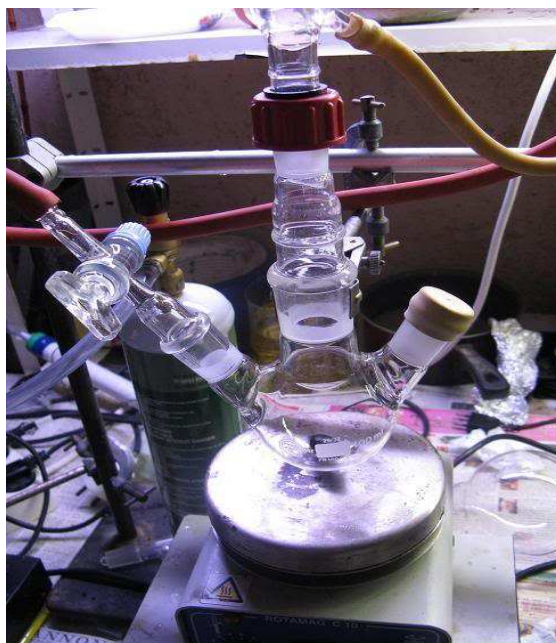
3.5. Дестилациони методи

3.5.1. Принципи

Дестилационите методи се базираат на директно мерење на содржината на вода отстранета од примерок од храна преку испарување: $\% \text{ влага} = 100 (M_{\text{WATER}}/M_{\text{INITIAL}})$. Спротивно, методите со испарување се индиректни, т.е. се базираат на индиректно мерење на содржината на вода во храната: $\% \text{ влага} = 100 (M_{\text{INITIAL}} - M_{\text{DRIED}})/M_{\text{INITIAL}}$. Во принцип, дестилационите методи вклучуваат загревање на примерок на храна кој има точно определена маса (M_{INITIAL}) во присуство на некој органски растворувач што не е мешлив со водата. Водата од примерокот испарува и потоа се собира во стаклен сад при што се мери нејзината маса (M_{WATER}).

3.5.2. Метод на Dean и Stark

Методите на дестилација наједноставно се илустрираат со еден специфичен пример, т.е. методот на Dean и Stark. Позната измерена маса на храна се става во стаклен сад во кој се додава некој органски растворувач, ксилен или толуен. Органскиот растворувач мора да биде немешлив со вода и да има повисока температура на вриење од водата, да биде помалку густ од водата, и да биде безбеден за човекот (неотровен). Стаклениот сад што го содржи примерокот се поврзува со ладило од страната, и притоа смесата почнува да се загрева.



Апаратура која се користи при Dean-Stark метода

Водата присутна во примерокот од храна за анализа испарува и се движи нагоре во ладилото каде се кондензира и се претвора во течна вода, која потоа се движи во сад за собирање на дестилатот. Кога ќе нема повеќе вода во примерокот, процесот на дестилација запира, се чита волуменот на испарената вода и се пресметува содржината на влага.

3.5.3. Практични забелешки

Постојат повеќе фактори што може да доведат до погрешни резултати: (а) можно е да се формираат емулзии помеѓу водата и употребуваните органски растворувачи при што постојат тешкотии за раздвојување на водата од таквите емулзии; (б) капки на вода може да се залепат во внатрешноста на стаклениот прибор во кој се врши дестилацијата (в) при повисоки температури возможно е да настане декомпозиција на одредени термолабилни состојки од храната.

3.5.4. Предности и недостатоци

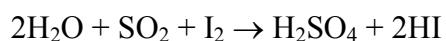
- *Предности:* Погодна за определување на влага во хранливи продукти што имаат мала количина на вода, погодна за примероци што содржат органски масла како зачини и лековити билки, затоа што маслата ќе се растворат во органскиот растворувач и нема да испарат надвор; инструментацијата е релативно евтина и лесна за работа.
- *Недостатоци:* Методата на дестилација е деструктивна, се употребуваат запаливи органски растворувачи, не е применлива на сите видови на храна.

3.6. Методи што се базираат на хемиски реакции

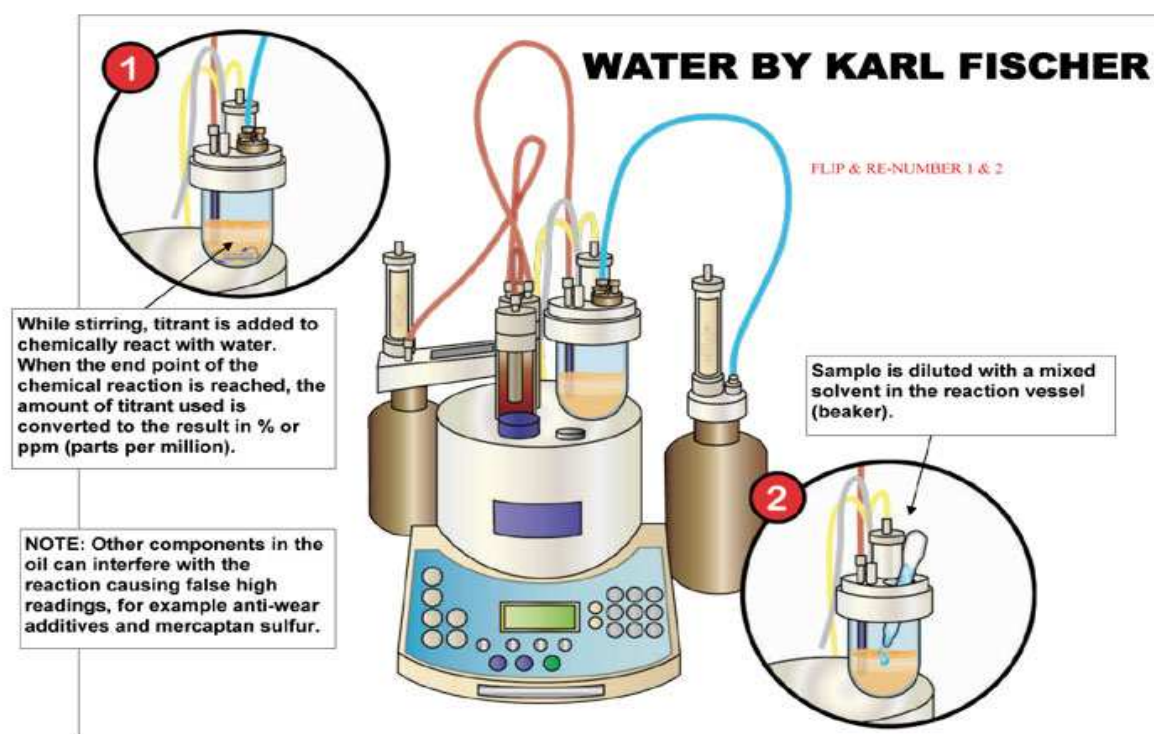
Реакциите помеѓу водата и одредени хемиски реагенси може да се употребат како база за определување на концентрацијата на влага во храната. Кај овие хемиски методи, специфичен реагенс се додава во храната која реагира на специфичен начин со водата при што се добиваат мерливи промени во внатрешноста на системот, на пример, маса, волумен, притисок, рН, боја, спроводливост. Мерливите промени во системот се доведуваат во директна корелација со содржината на влага со употреба на калибрациони криви. За да се направат точни мерења, важно е *хемикалијата* реагенс да биде *специфична* т.е. да реагира со сите присутни молекули на вода, но не со другите компоненти во храната матрица. За таа цел, во прехранбената индустрија се употребува титрацијата по *Karl-Fisher* и *методот на подрукција на гас*. Методите на хемиски реакции најчесто не вклучуваат употреба на топлина, така што овие методи се погодни и за анализа на влага во присуство на термолабилни соединенија.

3.6.1. Метода по Karl-Fisher

Титрационата метода според Karl-Fisher често се употребува за определување на влагата во хранливи продукти што содржат мала количина на храна (пр. сушено овошје и зеленчук, кафе, масти и масла). Оваа метода се базира на следната хемиска реакција:



Оваа реакција е употребена од причина што HI е безбојна супстанца, додека I₂ е кафеаво црвена супстанца. Тоа значи дека ќе забележиме видлива промена во бојата кога водата ќе реагира со додадените хемиски реагенси. Сулфур диоксидот и јодот се гасовити супстанции и тие лесно испаруваат и излегуваат надвор од растворот. Поради тие причини, горната реакција е модификувана со додавање на органски растворувачи (пр. C₅H₅N) што ќе ги задржи SO₂ and I₂ во растворот, при што принципите на методата остануваат непроменети.



Шематски приказ на титрационата метода според Karl-Fisher

Храната што треба да се анализира се става во ерленмаер во кој е ставен и органскиот растворувач, и потоа смесата се титрира со т.н. *Karl Fisher реагенс* (раствор што содржи јод). Се додека постои вода во примерокот, растворот при додавање на јод ќе биде безбоен, но откако целата вода ќе изреагира, тогаш наредната капка од јод ќе даде кафеаво црвенкасто обојување на растворот поради присуството на елементарен неизреагиран I_2 . Потоа се одмерува волуменот на јодот што сме го потрошиле за титрација на пробата и истиот може да се спореди со волуменот на јод потрошен при титрација на вода при конструкција на калибрациона стандардна крива.

3.6.2. Метода на продукција на гас

Постојат и комерцијални инструменти што функционираат на база на издвојување на гас како резултат на специфична хемиска реакција помеѓу водата и дадени специфични хемиски реагенси. Така на пример, кога примерок од храна за анализа се измеша со прав од калциум карбид, тогаш се издвојува гас ацетилен кој е пропорционален со концентрацијата на вода во храната.



Ослободениот гас ацетилен може да се измери на голем број начини и преку него индиректно да се пресмета количината на вода во храната.

3.7 Физички методи

Голем број на аналитички методи се развиени за да се одреди содржината на влага во храната, што се базираат на фактот дека водата има значително различни физички карактеристики од матрицата на храната како на пример, густина, електрична спроводливост или индекс на рефракција. Овие методи најчесто се соодветни за анализа на храна во која составот на матриксот не се менува значително, но се менува односот вода-матрикс. Така на пример, содржината на вода во емулзиите масло во вода може да се

определи со мерење на густината или електричната спроводливост бидејќи густината и електричната спроводливост на водата се значително повисоки од тие на маслото.

Доколку пак составот на матриксот се менува значително, тогаш не е возможно прецизно да се определи содржината на влагата бидејќи и други состојки на храната може да дадат електрична спроводливост со иста вредност како тие на водата, што може да доведе до погрешни заклучоци.

3.8 Спектроскопски методи

Во основа на спектроскопските методи лежат интеракциите на електромагнетното зрачење со материјалите, при што се добиваат информации за нивниот состав.

Карактеристични типови на електромагнетно зрачење се X-зраците, UV-видливото зрачење, микробрановото зрачење и инфрацрвеното зрачење. Спектроскопските методи развиени за определување на содржината на вода во храната се базираат на фактот дека водата апсорбира електромагнетно зрачење со точно определена бранова должина и тоа зрачење е различно по природа и енергија од зрачењето што го апсорбираат другите компоненти присутни во храната. Најчесто употребуваните спектроскопски методи се базирани на апсорпција на микробраново и инфрацрвено зрачење. Овие зрачења предизвикуваат вибрации или ротации во молекулите што ги апсорбираат овие зраци кога примерокот на храна е озрачен со нив. Анализите со овие методи се изведуваат на бранови должини каде што молекулите на испитуваните компоненти можат да апсорбираат зрачење, но на тие бранови должини другите компоненти од храната не апсорбираат зрачење. Со мерење на апсорпцијата на зрачење можеме да ја определиме содржината на вода во примероците. Имено, колку е поголема содржината на водата во примерокот, толку апсорпцијата ќе биде поголема, па со конструкција на калибрациони криви релативно едноставно може да се определи содржината на вода во непознат примерок од храна. Главна предност на овие методи е што тие не се деструктивни и се релативно брзи и точни, а потребна е и мала количина на примерок за анализа.

4. Анализа на пепел и минерални материи

4.1 Вовед

“Содржината на пепел” е мерка за вкупната содржина на минерални материи присутни во храната, додека “содржината на минерали” е мерка за содржината на специфични неоргански супстанции присутни во храната како Ca, Na, K и Cl. Определувањето на содржината на пепел и минерални материи во храната е битно од неколку причини:

- *За етикетите на кои се забележува составот.* Концентрацијата и природата на секој вид на минерали присутни во храната секогаш мора да бидат означени на етикетата од хранливиот производ.
- *Квалитет.* Квалитетот на голем број хранливи производи зависи од концентрацијата и природата на минералните материи. Својствата како што се вкусот, бојата, стабилноста и конзистентноста на храната во голема мера се функција од содржината и типот на минералните материи
- *Микробиолошка стабилност.* Високата концентрација на минерални материи често пати е неопходна за спречување на развојот на микроорганизмите и бактериите во храната.
- *Хранлива вредност.* Некои минерали се есенцијални во исхраната (e.g., калциум, фосфор, калиум и натриум), додека пак други се отровни (e.g., олово, жива, кадмим, алуминиум и сл.).
- *Процес на преработка.* Многу е важно да се знае содржината на минералните материи во храната за правилно да се дизајнира процесот, бидејќи минералните материи директно влијаат на физичките и хемиските својства на храната.

4.2. Определување на содржината на пепел

Пепелта е неоргански остаток што останува после отстранувањето на водата и органските материи од храната. Најголем дел од аналитичките техники за определување на минералните материи во храната се темелат на фактот дека минералите („аналитот,“) не можат да се уништат или отстранат со загревање, додека органските материи и водата испаруваат во облик на гасови при термички третман. Трите главни типови на аналитички постапки за определувањето на пепел во храната се: *сува минерализација, влажна минерализација и сува минерализација при ниски температури*. Содржината на пепел во свежа храна обично не надминува 5%, меѓутоа постојат и храни во кои содржината на пепел е значителна, на пример сушеното говедско месо содржи 12% пепел.

4.2.1. Подготовка на примерок

Како и при останатите анализи на храна, многу е битно да се селектира репрезентативен примерок на храната за анализа, што ќе ги претставува својствата на целокупната популација. Најчесто, примероци со маса од 1-10g се употребуваат за анализа на содржината на влага. Цврстата храна најпрво се ситни и внимателно се меша. Пред да се почне со определувањето на пепел во храната, обично храните со голема количина на влага се сушат одредено време. Храните пак со голема количина на масти и масла најчесто се обезмастуваат пред да се почне со анализа на пепелта. Проблеми при одредување на содржината на пепел може да настанат и од нечиста стакларија што се употребува при анализите. Се препорачува при сите анализи да се употребува дејонизирана вода.

4.2.2. Сува минерализација

При постапката на сува минерализација се употребуваат доста високи температури што се постигнуваат во муфална печка каде се развиваат температури помеѓу 500 и 600 °C. При овие температури, водата и другите испарливи супстанции испаруваат, додека органските супстанции во присуство на кислород се оксидираат и се декомпозираат до CO₂, H₂O и N₂. При овие постапки, минералните материи се оксидираат до оксиди, сулфати,

фосфати хлориди или силикати. Иако најголем дел од минералните материи не се испарливи на овие температури, сепак, одреден број на минерали како оловото, железото и живата можат да испарат и да бидат изгубени од неорганскиот дел. За определување на претходнопоменатите метали потребно е да се употреби друга постапка за нивно определување.

Примерокот од храна земен за анализа се мери на вага пред и после постапката на минерализација, при што количината на пепел се определува според следните формули за сува и влажна минерализација, соодветно:

$$\% \text{ Ash (dry basis)} = \frac{M_{\text{ASH}}}{M_{\text{DRY}}} \times 100$$

$$\% \text{ Ash (wet basis)} = \frac{M_{\text{ASH}}}{M_{\text{WET}}} \times 100$$

каде M_{ASH} е масата на примерокот после минерализација, додека M_{DRY} и M_{WET} се масите на оригиналните примероци земени за анализа пред процесите на сува и влажна минерализација.

Постојат повеќе комерцијални садови за минерализација на храната што се отпорни на високи температури. Најпознати од нив се Pyrex, porcelain, челик, и платина. Изборот на сад за минерализација зависи пред сè од типот на примерокот што треба да се минерализира. Најчесто се употребува порцеланот поради неговата голема отпорност на високи температури и на киселини, а и поради ниската цена на чинење. Порцеланот не е отпорен на силни бази и може лесно да кородира кога е во присуство на алкални раствори. При овие постапки, примерокот се изложува на 500-600 °C за време од 24 h.

- *Предности:* безбедна метода, не се потребни многу реагенси, повеќе примероци може да се анализираат симултано.

- *Недостатоци:* долго време за анализа (12-24 h), муфалните печки се прилично скапи, а на високи температури можна е загуба на некои полесно испарливи минерални материи како Cu, Fe, Pb, Hg, Ni, Zn.

Од неодамна постојат и комерцијални инструменти за определување на минерални материи што се базираат на примена на микробранови зрачења.

4.2.3. Влажна минерализација

Влажната минерализација е постапка што се применува при подготовка на примероци за други последователни анализи. При оваа постапка се врши деструкција и отстранување на органските материи од храната, така што во растворот остануваат само минералните материи. Примерокот од храна за анализа се става во колба во која има силни оксидирачки киселини како азотна, перхлорна или сулфурна киселина, и потоа се загрева. Загревањето трае се додека органските материи комплетно испарат од колбата, а во растворот остануваат само минералните материи што ќе бидат најчесто во форма на оксиди. Температурата на која ќе се изведува оваа минерализација, како и времето на минерализацијата зависат од типот на киселините што се употребуваат во процесот. Обично влажната минерализација трае од 10 минути до неколку часа а се одвива на температури од околу 350°C. Растворот што притоа се добива е соодветен за понатамошни анализи на минерални материи.

- *Предности:* мала загуба на минералните материи поради ниската температура што се применува.
- *Недостатоци:* се употребуваат опасни минерални киселини.

4.2.4. Минерализација при ниска температура

Примерокот од храна за анализа се става во стаклена комора од која воздухот е изваден под вакуум. Во комората се пушта мала количина на кислород кој потоа се разградува до насцентен кислород т.е. кислороден радикал ($O_2 \rightarrow 2O\cdot$) со апликација на електромагнетно радио зрачење. Во присуство на овој насцентен кислород, органските материи присутни во храната многу брзо се оксидираат, а водата испарува поради температурата од околу $150^\circ C$. Релативно ниската температура при која се одвива овој процес оневозможува испарување на лесно испарливи минерални материи.

- *Предности:* мали можности за испарување на минерални материи
- *Недостатоци:* Релативно скапа техника.

4.3. Определување на содржина на специфични минерални материи

Познавањето на содржината на природата на минералните материи присутни во храната е многу важно да се знае како податок во индустријата за храна. Главните физички и хемиски параметри што ги разликуваат минералните материи од останатите состојки во матриксот на храната се: ниската испарливост, нивната способност да реагираат со специфични реагенси и при таквите хемиски реакции да дадат специфични мерливи својства и видливи промени во системот, како и нивните специфични електромагнетни својства. Најсоодветна техника за определување на минералните материи и атомска апсорпциона спетроскопија. Покрај тоа, за анализа на минералните методи се користат и голем број на едноставни лабораториски методи што се многу поевтини но помалку прецизни и побавни од атомската спетроскопија.

4.3.1. Подготовка на примерокот

Во најголем број од аналитичките техники што се употребуваат за анализа на минералните материи, примерокот од храна треба да биде во преведен во воден раствор. Поради тоа, потребно е да се отстранат органските материи од примерокот, а тоа најчесто

се прави со методите на минерализација што се објаснети претходно. При процесот на минерализација, многу е битно да не испарат и некои од минералните материи. Друг можен извор на грешка при процесот на минерализација е присуството на минерални материи во водата што се употребува за растворање на примерокот. Со цел да се спречи тоа, се користи дејонизирана вода со висока чистота, а паралелно се снима и експеримент со чистата вода (слепа проба) што е употребена за растворање при постапката за анализа на храната. Откако ќе се сними слепата проба, тогаш од концентрацијата на минералите добиени во примерокот се одзема концентрацијата на минералите присутни во слепата проба.

4.3.2. Гравиметриска анализа

Кај гравиметриските методи за анализа, елементот што сакаме да го анализираме се преведува во талог со додавање на некој специфичен реагенс. Притоа се формира *тешко растворливо соединение (талог)* што има позната хемиска формула. Талогот потоа се отстранува од растворот со филтрирање, а потоа талогот се мие со вода се суши во сушилица и се вага. Потоа се пресметува масата на бараниот хемиски елемент преку едноставни хемиски равенки. Недостатокот на овие методи е тоа што не можат да се употребат за квантификација на елементи што се застапени во траги т.е. во многу ниски концентрации.

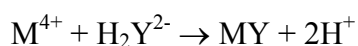
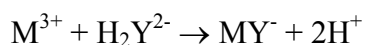
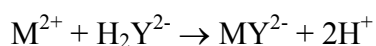
4.3.3. Колориметриски методи

Овие методи се базираат на промена на бојата на даден реагенс кога ќе стапи со даден специфичен минерал присутен во храната. Притоа се мери апсорбанцата на растворот на дадена бранова должина со помош на инструмент-спектрофотометар. Колориметриските методи се употребуваат за определување на голем број на минерални материи, како на пример ванадатите, молибденатите и сл.

4.3.4. Титрации

Комплексометриски титрации со реагенсот EDTA

EDTA е хемиски реагенс-комплексобразувач кој може да формира силни хемиски комплекси со голем број повеќевалентни метални јони. Динатриумовата сол на EDTA $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ најчесто се употребува бидејќи истата е достапна со висока чистота. Комплексите образувани помеѓу даден метален јон и EDTA може да се претстават со следните равенки:



Со овој метод се определува на пример содржината на калциум во храната. Откако примерокот на храна ќе се минерализира, тој се разредува со вода и потоа се прави базен со додавање на натриум хидроксид (pH 12.5 to 13). Потоа во растворот се додава индикатор што може да образува обоен комплекс со EDTA, и растворот се титрира со раствор на EDTA со позната концентрација. Притоа, комплексот на EDTA со супстанцата индикатор треба да биде многу понестабилен од комплексот на EDTA со испитуваниот метален јон (калциумот Ca^{2+} во нашиот пример). Откако целокупната количина на метален јон ќе биде комплексирана (т.е. врзана во стабилен комплекс) со EDTA, наредната додадена капка на EDTA ќе реагира со супстанцата индикатор и притоа ќе доведе до обојување на растворот. При оваа постапка се прави и калибрациона крива со познати концентрации на калциум, и непознатата концентрација на калциум се определува од волуменот на EDTA потрошен за титрација на калциумот во пробата од храна. Проблем кај оваа метода е присуството на поливалентни метални јони во примерокот кои исто така можат да реагираат со EDTA. За да се отстранат ваквите јони, може да се примени техника на поминување на примерокот низ колона за јонска измена, каде ќе се изврши сепарација на присутните јони во примерокот од храна.

Редокс реакции

Многу аналитички постапки за опеделување на минерални материи се базираат на оксидациско-редукциски реакции (или редокс реакции). Процесот на редукција претставува примање на електрони од дадени атоми или молекули, додека оксидација оддавање на електрони од други атоми или молекули што се во контакт со првите кои примаат електрони. Атомите или молекулите што примаат електрони викаме дека се редуцираат, додека оние атоми или молекули што оддаваат електрони се оксидираат. Процесите на оксидација и редукција секогаш одат спрегнати заедно, не е можно да имаме редукција, а да не постои оксидација во системот и обратно:



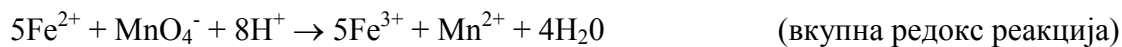
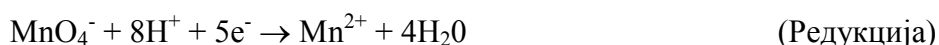
Најчесто, во редокс реакциите едната супстанца што учествува во редокс реакцијата е обоена, па откако таа целосно ќе изреагира со определуваниот метален јон, растворот ќе се обои со специфична боја откако ќе биде додадена првата капка во вишок од обоениот реагенс.

Така на пример перманганатниот јон (MnO_4^-) има виолетова боја (неговата оксидирана форма), додека пак Mn^{2+} јоните (редуцираната форма) се бледо розево обоени. На тој начин, редокс титрациите со перманганат може да се употребуваат како техники за определување на минерали во кои самиот перманганатен јон ќе игра улога и на редокс титрациско средство и на индикатор:



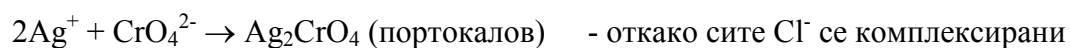
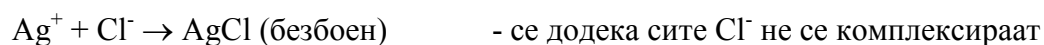
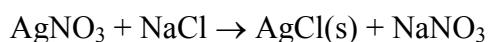
(виолетова боја) (слабо розева боја)

Така, при определување на железо во храната со титрација со калиум перманганат, во завршната точка на титрација растворот ќе се обои од слабо розева во виолетова боја, откако целото железо ќе биде иститрирано со перманганат, па наредната капка на вишок од перманганатот е таа што доведува до интензивно виолетово обојување. Реакциите при оваа техника се:



Таложни титрации

Кога најмалку еден од продуктите при титрацијата е во облик на талог, тогаш таквата титрација се нарекува таложна титрација. Најчеста ваква метода е методата по *Mohr* што се употребува за анализа на хлориди. Титрациското средство при методата по *Mohr* е сребро нитрат, а индикаторот е калиум хромат.

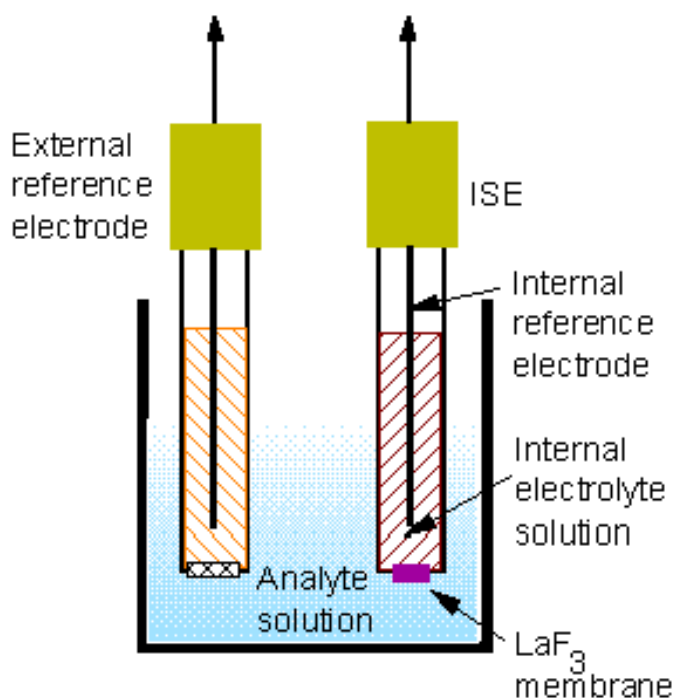


Бидејќи талогот сребро хлорид AgCl(s) е постабилен од талогот Ag_2CrO_4 , се додека во растворот има хлориди, тие ќе се таложат со додавање на сребро нитрат и талогот е бел. Откако сите хлориди ќе се исталожат, тогаш наредната додадена капка од сребро нитрат AgNO_3 ќе изреагира со хроматите CrO_4^{2-} при што ќе се добие сребро хромат Ag_2CrO_4 кој е талог со портокалова боја. Бидејќи се знае концентрацијата на растворот од сребро нитрат,

од потрошениот волумен лесно се пресметува концентрацијата на присутни хлориди во храната.

4.3.5. Јон-селективни електроди

Концентрацијата на голем број на метални јони и анјони (т.е. минерални материи) може да се определи со јоно-селективни електроди (ISE). Овие електроди работат на исти принципи како и рН-метрите, меѓутоа составот на стаклената електрода е различен и направен така да таа биде сензитивна на различни метални јони ада не биде сензитивна на H^+ . Специјални стаклени електроди се комерцијално достапни и се користат за определување на концентрациите на K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Li^+ , Ca^{2+} и Rb^+ од водени раствори. При овие мерења, две електроди се вртнуваат во воден раствор во кој е растворен минералот што треба да го определиме, едната електрода е јоно-селективна, а втората електрода е референтна електрода. Потенцијалот помеѓу двете електроди зависи од концентрацијата на определуваниот минерал во растворот. Концентрацијата на специфичниот јон се определува од калибрациона крива претходно конструирана со помош на стандардни раствори. Оваа техника е релативно едноставна и таа се употребува за определување на концентрацијата на сол во путер, сирење и месо, за определување на концентрацијата на калциум во млекото, како и за определување на концентрацијата на CO_2 во соковите. Недостаток на овие електроди е што не секогаш се сензитивни за само еден јон, па можни се интерференции доколку имаме присутно поголема концентрација на други јони кон кои електродата не е селективна. Овие проблеми може да се надминат со методи на комплексирање на интерферентните јони или со поддесување на рН. Јоно-селективните електроди се осетливи само на јоните што се наоѓаат во слободна состојба, а не и на јоните што се комплексирани и се наоѓаат во форма на хемиски соединенија.



Шематски приказ на определување на јони со помош на јоно-селективни електроди

4.3.6 Атомска спектроскопија

Определувањето на типот и содржината на минералите присутни во храната е многу едноставно и брзо со помош на методите на атомска спектроскопија. Оваа метода скоро целосно ги истисна традиционалните методи за анализа на минерални материји што претходно беа објаснети.

Принципи на атмосферната спектроскопија

Примарната причина за апсорпција или емисија на зрачење во атомската спектроскопија е поради *електронските трансфери* во надворешните електронски слоеви на атомите. Примероците што се користат во атомската спектроскопија се елементарни атоми од хемиските елементи. Енергетските промени што се поврзани со премин на

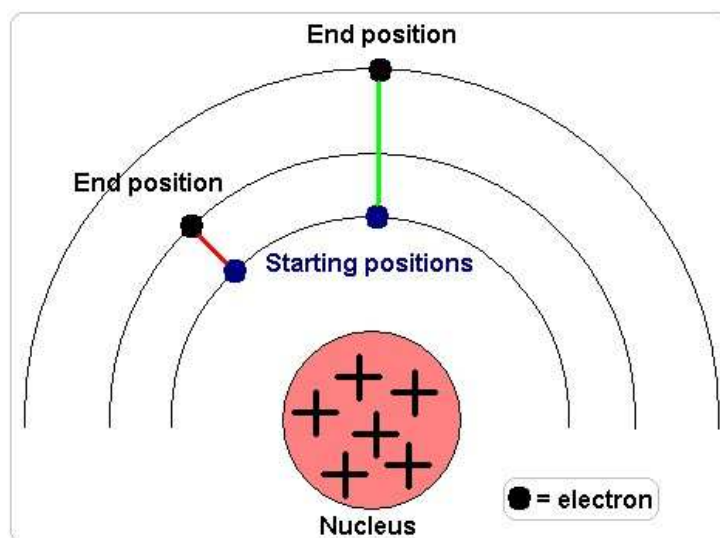
електрони помеѓу две енергетски нивоа е поврзана со брановата должина на апсорбираното зрачење преку изразот: $\Delta E = hc/\lambda$, каде, h = Планк-ова константа, c = брзина на светлината, а λ = брановата должина. На тој начин, за даден премин помеѓу две енергетски нивоа секогаш се апсорбира или емитура зрачење со точно определена бранова должина. Секој хемиски елемент има уникатна електронска структура, а со тоа има и уникатни енергетски нивоа во кои може да бидат електроните. Според тоа, секој елемент може да апсорбира само зрачење со специфични и точно определени бранови должини. Тоа значи дека секој елемент има свој сопствен електромагнетен спектар и тој спектар е сличен како отисоците на прстите. Овој феномен на специфични електронски спектри на атомите може да се примени за идентификација на секој поединечен елемент, бидејќи не постојат два идентични спектри од било кои елементи што се различни по природа. Поради тоа што секој елемент апсорбира зрачење што има карактеристична бранова должина, ние можеме да избереме зрачење со точно дефинирана бранова должина и со тоа да извршиме точна идентификација само на еден хемиски елемент. Притоа, апсорпција на зрачење се случува кога електрон од даден атом премине од основната енергетска состојба во состојба со повисока енергија. Емисија на зрачење се случува кога електронот што е во ексцитирана состојба се враќа назад во основната состојба. Бидејќи атомите можат да постојат во повеќе ексцитирани енергетски состојби, кај емисионите спектри на атомите постојат повеќе линии отколку кај апсорпционите спектри на атомите.

Атомската спектроскопија е техника што дава податоци и за природата и за концентрацијата на голем број на минерали присутни во храната. Природата на минералите се определува со мерење на положбата на пиковите во емисионите или апсорпционите спектри, додека пак концентрацијата на даден елемент се определува од интензитетот на линиите во спектрите. Редукцијата во интензитетот на еден електромагнетен бран што поминува низ примерок од храна е дадена со изразот: $A = -\log(I/I_0)$. Ова е познатиот Beer-Lambert закон кој може да се употреби за да се поврзи апсорбанцата со концентрацијата на непознат елемент во храната: $A = a \times b \times c$. во овие изрази A е симбол за апсорбанца, a е т.н. екстинционен коефициент, b е должина во која е сместен примерокот, а c е концентрацијата на мерениот хемиски елемент. Во пракса

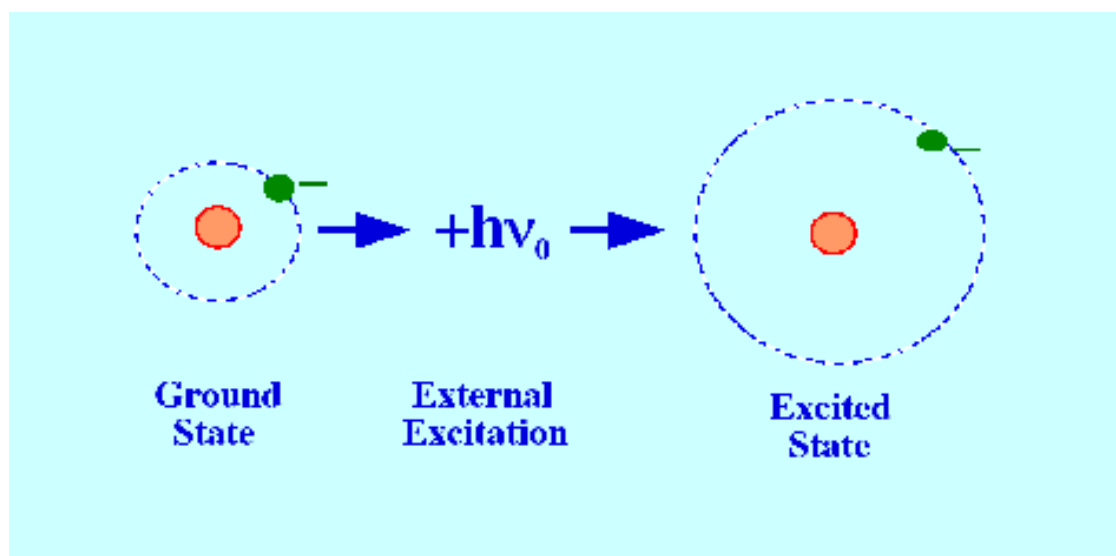
секогаш има отстапувања од горниот израз, па затоа секогаш се прават калибрациони криви со помош на стандарди. Во принцип, секогаш при анализите се пушта и слепа проба.

Атомска апсорпциона спектроскопија

Атомската апсорпциона спектроскопија (AAS) е аналитичка техника што се базира на апсорпција на UV-видливото зрачење од страна на слободни атоми што се наоѓаат во гасна состојба. Примерокот од храна за анализа најпрво се минерализира, а потоа се преведува во воден раствор. Ваквиот раствор потоа се става во инструментот каде се загрева и испарува, при што доаѓа до атомизација на минералите. Потоа, низ вака атомизираниот примерок се пушта зрачење, при што се мери апсорбираното зрачење на точно определена бранова должина. Избраната бранова должина треба да кореспондира со разликите во енергетските дозволени електронски премини на елементот што ни е од интерес. Информации за природата и за содржината на металот се добиваат со мерење на позицијата и на интензитетот на линиите во апсорпционите спектри што се добиваат при експериментите со овие инструменти.



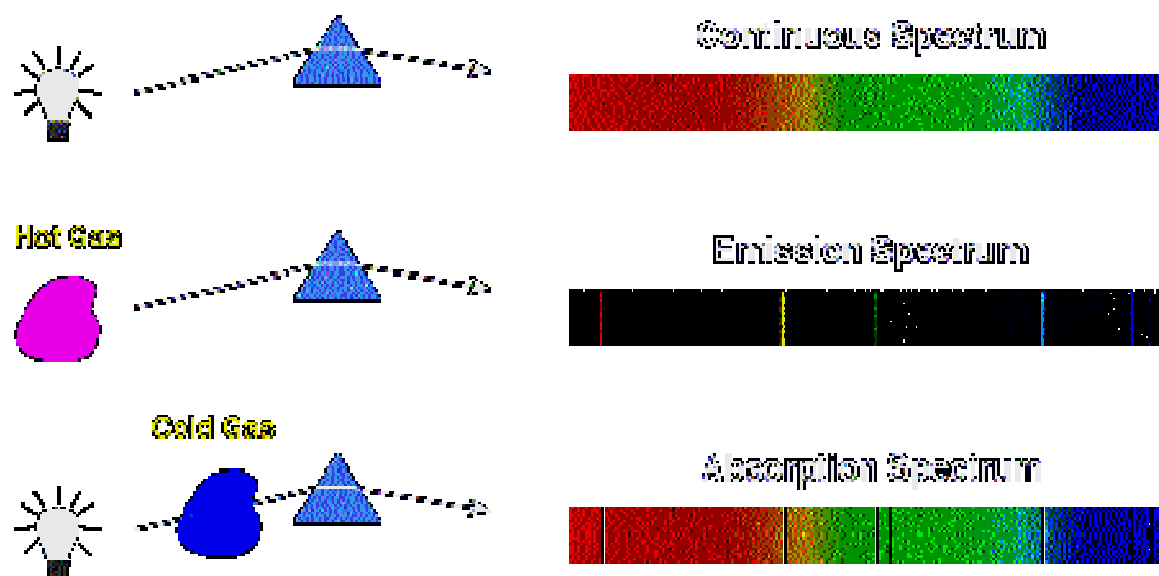
При апсорпцијата на електромагнетно зрачење, ЕЛЕКТРОНИТЕ преминуваат од ниво со пониска во енергетско ниво со повисока енергија



При апсорпција на квант од електромагнетно зрачење, електроните од атомот примаат енергија и атомите поминуваат од основна во ексциотирана состојба

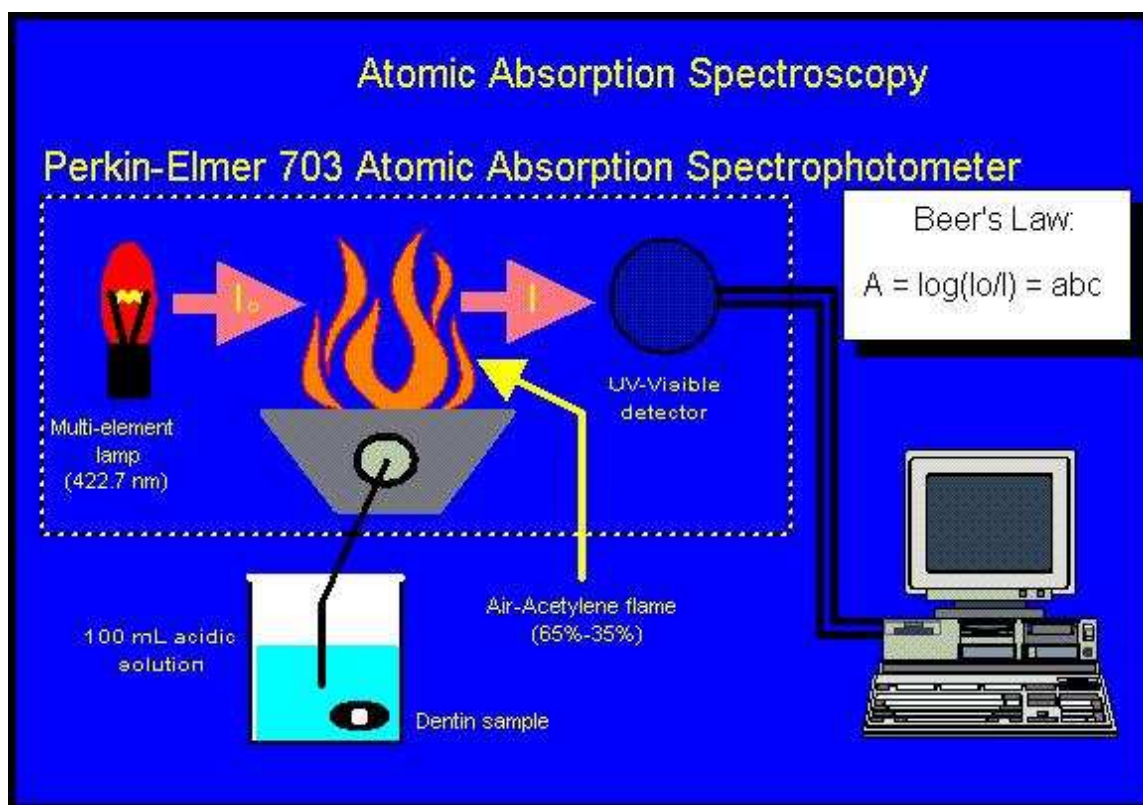
Инструментација

Извор на зрачење. Најчест извор на зрачење во AAS е т.н. шуплива катодна ламба. Тоа е една цевка наполнета со аргон или неон каде е спроведена една катодна жичка изработена од елементот што треба да биде анализиран во храната и уште една жичка што игра улога на анода. Кога помеѓу електродите ќе се нанесе потенцијална разлика (волтажа) од надвор, тогаш катодната жичка почнува да емитира карактеристично зрачење. Така на пример, ако катодата е направена од натриум, тогаш ќе биде емитиран карактеристичен спектар на натриум и т.н. Кога ова зрачење поминува низ примерок од храна што содржи натриумови атоми, дел од зрачењето емитирано од ламбата ќе биде апсорбирано од атомите на натриум присутни во примерокот од храна земен за анализа. Доколку сакаме да анализираме елемент калциум, тогаш треба да употребиме ламба за зрачење во чиј состав катодата ќе биде направена од калциум и сл.



Извори на континуиран, емисионен и апсорпциски спектар

Атомизер. Атомизерите се елементи од атомските апсорпциони спектроскопи што имаат намена да го претворат анализираниот примерок во индивидуални атоми. Процесот на атомизација се постигнува со примена на многу високи температури врз примерокот, и тој процес се состои од три фази: (i) отстранување на молекулите на вода во кои е растворени честичките (молекулите или јоните) од примерокот, (ii) конверзија на молекулите од состојките од храната во гасови (iii) атомизација на молекулите. На многу високи температури атомите може да преминат во јони (атоми или атомски групи што содржат полнеж), а овој феномен не е пожелен бидејќи спектрите на јоните се различни од спектрите на неутралните атоми. Според тоа, потребно е да се употребуваат температури што се доволно високи да ги преведам молекулите од состојките на храната во атоми, но да не бидат многу високи за да произведат јони од атомите. Во AAS се употребуваат два типа на атомизери: пламени и електротермички.



Шематски принцип на процесите во атомска апсорпциона спектроскопија

- Пламените атомизери се состојат од распрскувач и пламеник. Распрскувачот има функција да го претвора течниот раствор во аеросол. Примерокот се пушта под притисок да поинува низ тесна дупка во една комора наполнета со оксиданс и некој носач на гас (или горивен гас). Оксидантот и носачот на гас го носат примерокот во пламенот. Пламеникот е обично долг 5 -10 см доволно за да низ него помине зрачењето од изворот на радијација. Карактеристиките на пламенот може да се променат со промена на односот на оксидантот и на горивото што се користи за добивање на пламен. Воздух-acetelyne и азотен оксид-acetylene се најчесто употребуваните смеси од оксиденс и горивен гас. Со промена на односот на овие параметри може да добиеме пламени што ќе имаат различни температури. Тоа е многу битно со цел да добиеме температури што ќе предизвикаат атомизација, но не и јонизација на атомите.

- Во електротермичката атомска апсорпциона спектроскопија EAAS примерокот се внесува во мала графитна печка која се загрева со електрична енергија до температура помеѓу 2,000 - 3,000 °C, што е доволно висока да предизвика испарување и атомизација на примерокот. Печката е така позиционирана да зрачењето поминува точно низ атомизираниот примерок. Предноста на електротермичките атомизери е во тоа што се потребни помали количини на примерок, така што имаат и пониски граници на детекција. Главниот недостаток на овие атомизери е нивната висока цена и потечки се за ракување од другите слични инструменти.

Филтер за зрачење со точна бранова должина. Филтерот за селектирање на бранови должини е уред што е позициониран помеѓу пламеникот и детекторот. Неговата функција е да ги изолира спектралните линии што се од интерес и да ги издвои од спектралните линии на другите елементи присутни во примерокот.

Детектор/читач. Детекторот во суштина е фотомултипликациона туба што има функција да го претвори електромагнетното зрачење во електричен сигнал што ќе може да го читаме. Најчесто крајниот резултат компјутерски се отчитува во форма на бројки.

Атомска емисиона спектроскопија

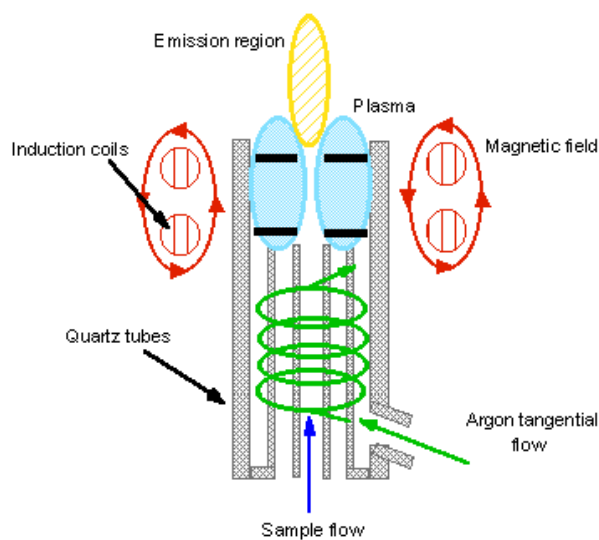
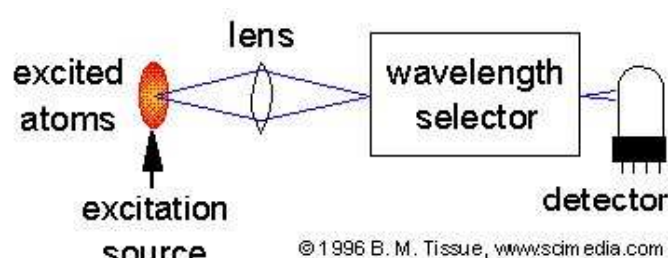
Атомската емисиона спектроскопија (AES) се разликува од AAS по тоа што кај AES се користи емисијата на зрачењето од примерокот за анализа. Поради овие причини, примероците обично треба да бидат загреани на многу повисоки температури со цел атомите да апсорбираат зрачење, а при враќањето во основна состојба да го емитираат вишокот на примена енергија. Проблемите кај оваа техника се во фактот што повисоките температури може да доведат до јонизирање на примерокот и до појава на нови спектри што се разликуваат од спектрите на нејонизирани атоми во основна состојба.

Инструментација

Во AES самиот примерок за анализа се однесува како детектор за зрачењето и не е потребно да има посебен извор на зрачење. Примерокот за анализа се загрева до температура каде што се атомизира, и притоа голем дел од атомите поминуваат во ексцитирана состојба. Потоа, при преминот на електроните од атомите што примиле вишок на енергија се врши емисија на зрачење кога тие ќе се вратат во нивната основна состојба. Бидејќи дозволените енергетски нивоа за различни атоми се различни, различните атоми ќе продуцираат различни емисиони спектри. Бидејќи храната содржи голем број на различни минерални материи, спектарот што при оваа техника се добива содржи голем број на пикови. Поради тоа, емитираното зрачење од страна на атомите во примерокот поминува низ голем број на филтри за бранови должини со цел да бидат изолирани линиите што ни се од интерес за даден хемиски елемент.

Извор на атомизација и ексцитација. Целта на овој извор на атомизација-ексцитација е да го атомизира примерокот и да ги ексцитира атомите при што тие примаат голем дел од радијационото зрачење. Најчест извор на атомизација и ексцитација се пламенот и индуктивно спрегната плазма Plasma (ICP).

- Во пламената AES системот е составен од распрскувач и пламеник што ги атомизира минералите присутни во храната и притоа ексцитира голем дел од атомите.
- Во AES со индуктивно спрегната плазма се употребува посебен уред за загревање на примероците за анализа што развива температури од 6,000 до 10,000 K во присуство на онизиран аргон. При овие температури, атомите од минералите присутни во храната не се јонизираат поради големата концентрација на аргонски јони што се произведуваат. Имено, при реакцијата на јонизација на аргонот ($\text{Ar} \Leftrightarrow \text{Ar}^+ + e^-$) се ослободуваат голема количина на електрони што ја поместуваат ранотежата на јонизација на атомите кон страната на неутралните атоми, т.е. реакцијата $\text{M}^+ + e^- \Leftrightarrow \text{M}$ се поместува кон формата M.



Шематски приказ на Атомската Емисиона Спектроскопија

Филтри за бранови должини. Филтрите за бранови должини се употребуваат за да ги изолираат и сепарираат линиите што се карактеристични за материјалот (т.е. хемискиот елемент) што е од интерес во анализата од другите спектрални линии на атомите присутни во примерокот.

Практични забелешки

Пред да се почне со мерење со атомска апсорпциона спектроскопија, потребно е да се минерализира примерокот од храна. Потоа, сувиот остаток се раствора во соодветен растворувач, како што е водата или разредена HCl, пред примерокот од растворот да биде инјектиран во инструментот. Во некои случаи можно е да се анализираат примероци и без да бидат минерализирани. Растителните масла на пример може да се растворот во

соодветен растворувач и директно да бидат вбризгани во инструментот. Концентрацијата на минералите (неорганските материи) присутни во храната обично се во многу ниски, па поради тоа многу е битно да се употребуваат реагенси со многу висока чистота како би се избегнало добивање на резултати со повисоки концентрации на минерални материи кои би дошле од употребуваните реагенси. И стакларијата што се употребува при анализите мора да биде екстремно чиста и сува. Притоа, потребно е секогаш да бидеме сигурни дека во примерокот нема супстанции што може да интерферираат или да пречат при определувањето на бараниот елемент. Постојат голем број на различни методи за отстранување на ваквите интерференти.

5. Анализа на липиди (масти и масла)

5.1. Вовед

Липидите се едни од главните компоненти во храната и тие се многу битни во исхраната од различни причини. Тие се еден од главните извори на енергија, а учествуваат и во голем број на битни клеточни и биолошки функции. Од друга страна, преголемата конзумација на липиди доведува до појава на голем број на здравствени проблеми, пред се големата концентрација на холестерол е крајно непожелен параметар. Во голем број на хранливи производи, липидите се главните состојки што го определуваат квалитетот на храната како вкусот и мирисот, агрегатната состојба, бојата и сл. Бидејќи отстранувањето на липидите од хранат ќе доведе до промена на квалитетот на храната, скоро невозможно е да се произведуваат хранливи производи што нема да содржат липиди. Бидејќи липидите се склони на оксидација и притоа се добиваат продукти со лош мирис, многу е битно да се контролира содржината на липиди во хранливите производи. Некои од најчестите параметри што се определуваат кај липидите се:

- Вкупната концентрација на липиди
- Видот на липиди
- Физичко-хемиските параметри на липидите, како кристализација, точка на топење, реолошки карактеристики, густина и боја
- Структурната организација на липидите внатре во храната

5.2. Својства на липидите во храната

Липидите се дефинираат како супстанции што се растворливи во органски растворувачи (пр. ether, hexane или chloroform), но не се растворливи во вода. Во липиди спаѓаат триацилглицеридите, диацилглицеридите, моноацилглицеридите, слободните масни киселини, фосфолипидите, стеролите каретиноидите, како и витамините растворливи во масти и масла т.е. витамините А, Д, Е и К. Според тоа, липидната фракција во храната е

крајно разновидна. Во најголем број на случаите, триацилглицеридите се најзастапената фракција од сите липиди и на нив отстапуваат 95 до 99% од вкупната концентрација на липиди присутни во храната. Триацилглицеридите се естри на тровалентниот алкохол глицерол со вишите масни киселини. Вишите масни киселини обично имаат парен број на С-атоми во својот состав кој се движи од 10 С-атоми па нагоре. Термовите како *липиди*, *масти* или *масла* обично се синоними и често пати се употребуваат еквивалентно. Притоа, под терминот маст се подразбираат липиди што се во цврста агрегатна состојба на собна температура, додека под терминот масло се подразбираат липиди што се во телна агрегатна состојба на собна температура.

5.3. Земање на примерок и мерки на чување

Како и кај секоја аналитичка процедура, валидноста на добиените резултати во голема мера зависи од соодветното земање на примерокот за анализа пред почетокот на анализата. Во идеален случај, составот на примерокот за анализа треба што е многу поблиску да одговара на составот на целокупната популација од храна или хранливи производи. Подготовката на примерокот за анализа при анализата на липиди зависи од природата на храната што се анализира (*нр.* месо, млеко, маргарин, путер и сл.), од природата на аналитичката процедура што се употребува, како и од типот на липидноста својство што се анализира (*нр.* испарливост, подложност на оксидација, физичка состојба и сл). Пред да одлучиме каква постапка на подготовка на примерок ќе примениме, потребно е да се знае физичката структура и локацијата на липидите во храната. Бидејќи секоја храна е различна, различни ќе бидат и постапките за подготовка на примерокот за анализа. Генерално, подготовката на примерокот за анализа треба да се изведува во такви услови при кои се минимизираат можностите за промена во својствата на испитуваниот примерок пред тој да биде однесен на анализа. Најчесто за да се спречи оксидацијата, примероците се пакуваат во атмосфера на инертен гас (азот) и се чуваат при ниски температури, а амбалажата е од материјал кој не пропушта светлина во големи количини.

5.4. Определување на вкупната концентрација на липидите

5.4.1. Вовед

Определувањето на вкупната концентрација на липиди во храната е значајно од повеќе причини и тоа:

- Економски (да не се изгубат битни состојки од храната)
- законски (да се почитуваат стандарди што се декларирани на етикетата од производот)
- здравствени (да се произведуваат производи со мала содржина на липиди)
- Квалитет (својствата на храната во голема мерка зависат од содржината на присутни липиди во неа)
- Процес на обработка (процесот на обработка на храната зависи во значителна мера од вкупната содржина на липиди)

Основните физичко-хемиски особини на липидите ("аналитот") според кои липидите се разликуваат од другите состојки во храната ("матриксот") се нивната растворливост во органски растворувачи, немешливоста со водата, релативно ниската густина и спектроскопските карактеристики. Аналитичките техники што се употребуваат за определување на вкупната содржина на липиди главно се категоризираат во три типа и тоа: (i) екстракција со органски растворувачи; (ii) безрастворувачка екстракција (iii) инструментални методи.

5.4.2. Екстракција со растворувачи

Фактот што липидите се растворливи во органски растворувачи а не се растворливи во вода е основен феномен што се користи за сепарација на липидите од компонентите што се растворливи во вода а се присутни заедно во храната. Овие методи се најчесто употребувани за изолација на липидите од храната.



Екстракција со органски растворувач

Подготовка на примерок

Подготовката на примерок за екстракција со органски растворувач опфаќа повеќе чекори и тоа:

Сушење на примерокот. Потребно е да се направи сушење на примерокот пред почетокот на екстракцијата со цел да се отстрани водата, која пак, доколку е присутна, спречува голем дел од липидите присутни во храната да бидат растворени во органскиот растворувач при процесот на екстракција.

Редуција на големината на примерокот. Исушените примероци од храна се сецкаат на мали парчина т.е. се иситнуваат со цел да се направи хомогена маса и да се зголеми

допирната површина. На тој начин екстракцијата ќе биде поуспешна. Сецкањето се извршува при ниски температури со цел да се избегне оксидацијата на липидите.

Киселинска хидролиза. Некои типови на храна содржат липиди што можат да се комплексираат со протеините (липопротеини) или со полисахаридите (гликолипиди). За да се определи концентрацијата на липидите од овие компоненти, потребно е да се раскинат врските што ги поврзуваат липидните со нелипидните компоненти пред да се направи екстракцијата со растворувачи. За таа цел обично се употребува постапка на т.н. киселинска хидролиза, со цел да се скинат врските на липидите со нелипидните компоненти од храната. За таа намена, примерокот од храна обично се врие за време од 1 h во присуство на 3M HCl.

Избор на органски растворувач. Идеален растворувач за екстракција на липидните компоненти од храната е оној кој што би ги екстрахирал сите липидни компоненти од храната, а нема да ги екстрахира другите компоненти од матриксот. Во пракса, ефикасноста на органскиот растворувач зависи од ПОЛАРНОСТА на растворувачот и поларноста на липидите присутни во храната. Поларните липиди (како што се гликолипидите или фосфолипидите) се во поголема мерка растворливи во поларни растворувачи (како во алкохоли на пример) отколку во неполарни растворувачи (hexane на пример). Од друга страна, неполарните липиди (како триацилглицеролите) се повеќе растворливи во неполарни одошто во поларни растворувачи. Фактот што различни липиди во различна мера се раствораат во даден растворувач покажува дека е невозможно да се најде растворувач во кој сите липиди присутни во храната идеално би се ратсвориле во него. Според тоа, вкупната содржина на липиди во храната определена со екстракција со органски растворувач зависи пред се од природата на липидите, како и од природата на органскиот растворувач што се користи при екстракцијата. Покрај тоа, растворувачите што се користат при овие екстракции треба да бидат релативно ефтини, да не бидат токсични и да имаат релативно ниска температура на испарување за да би можеле лесно да се отстранат откако во нив липидите ќе бидат екстрахирани и извлечени од храната.

Ethyl ether и петролеум ether се најчесто употребуваните растворувачи, иако во голема мерка се употребуваат пентан и хексан.

Повеќекратна екстракција со органски растворувачи

Овие методи се базирани на интензивно мешање на примерокот со органскиот растворувач што се изведува во соодветен сад за екстракција. Притоа, смесата во садот за сепарација се меша интензивно за одредено време, а потоа се остава органската и водената фаза да се сепарираат под дејство на гравитацијата или под дејство на центрифугална сила. Потоа, водената фаза се испушта, додека органската фаза се собира, од неа се испарува растворувачот и во испарениот фрагмент остануваат присутни само липидите. Содржината на липидите притоа се пресметува според формулата $\%Lipid = 100 \times (M_{lipid}/M_{sample})$. Оваа процедура на екстракција треба да се повтори повеќе пати со цел да се извлече максимална можна концентрација на липиди од примерокот за анализа т.е. екстракцијата да биде успешна. Ефикасноста на дадена екстракција на липид квантитативно се изразува преку т.н. константа на партиција што е дефинирана со изразот $K = c_{solvent}/c_{aqueous}$, каде $c_{solvent}$ и $c_{aqueous}$ се концентрациите на липидите во органскиот растворувач и во водената фаза, соодветно. Колку е поголема вредноста на коефициентот на партиција K , толку екстракцијата е поефикасна.

Семи-континуирана екстракција со органски растворувач

Семи-континуираните методи на екстракција најчесто се применуваат за да се зголеми ефикасноста на екстракцијата на липидите од храната. Методот на Soxhlet е најчест пример за ваков тип на екстракција. Кај оваа метода, примерокот најпрво се суши, потоа се сецка на мали парчиња и се става во порозна инка. Инката се става во екстракциона комора во која од горната страна има контејнер во кој е сместен растворувачот, а на долната страна има кондензатор. Притоа, со загревање на делот во кој е сместен растворувачот, тој испарува и се движи низ кондензаторот каде се претвора во течност, а потоа паѓа во комората каде е сместен примерокот за анализа. Притоа,

растворувачот ќе го обиколи примерокот за анализа. Откако ќе го обиколи примерокот за анализа, растворувачот ќе ги екстрахира липидите од него и потоа откако ќе ја исполни комората ќе почне да се прелива во собирен сад. Во тој собирен сад сега се наоѓаат липидите, кои со зголемување на температурата остануваат внатре, додека растворувачот ќе испари. Со испарување на растворувачот, во собирниот садостануваат само липидите, при што се мери нивната маса M_{lipid} . Процентот на липиди во дадената маса од примерокот M_{sample} се пресметува според формулата $\% \text{Lipid} = 100 \times (M_{\text{lipid}}/M_{\text{sample}})$. Недостаток на методата е што трае неколку часа.

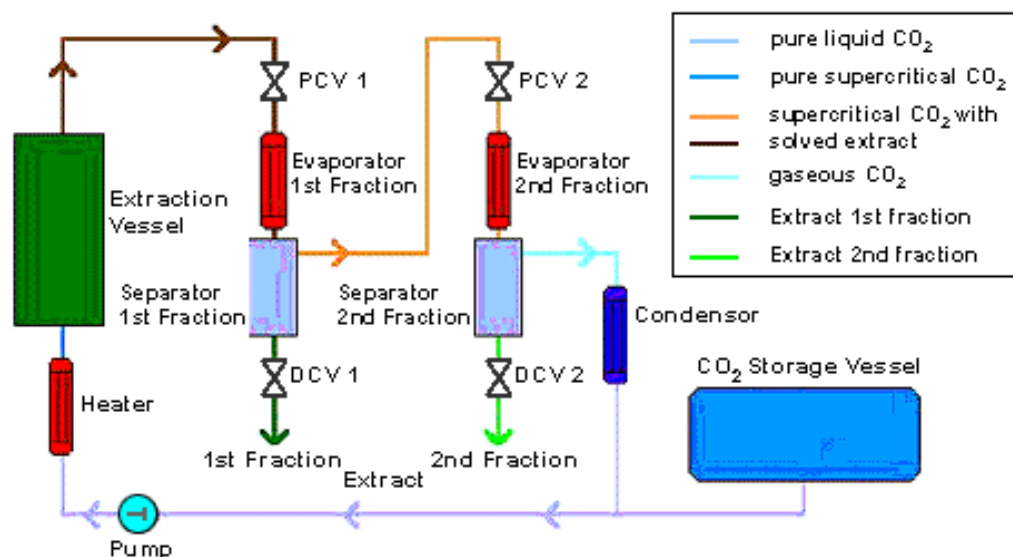
Континуирана екстракција со органски растворувач

Методата на Goldfish е слична со методата на Soxhlet, со исклучок што комората за екстракција е дизајнирана на тој начин што растворувачот само паѓа врз примерокот, а не се задржува во комората и не останува предолго време во контакт во примерокот за храна. Ова го намалува времето потребно за екстракција, но постои недостаток поради поминување на растворувачот низ канали, при што нема да постои можност за целосна екстракција на липидите. Ова не е проблем кај методата на Soxhlet бидејќи таму растворувачот цело време го обиколува примерокот на храна за анализа.

Суперкритична течна екстракција

Екстракцијата со растворувачи може да се изведе и со помош на специјални инструменти каде како средство за екстракција се користи т.н. суперкритичен јаглероден диоксид наместо органски растворувач. Овие инструменти наоѓаат се поголема примена поради ниската цена на чинење, а корисни се и од еколошка гледна точка поради примената на CO_2 . Доколку CO_2 кој е под висок притисок се загрее над некоја критична температура, тогаш тој преминува во т.н. суперкритична течност кој има својства и на гас и на течност. Фактот што тој се однесува како гас му овозможува лесно да пенетрира во

храната и да екстрахира дел од липидите. Од друга страна, фактот што се однесува како течност му овозможува да раствори голем дел од липидите, посебно при високи притисоци.



Шема на постројка за суперкритична екстракција со CO_2

5.4.3. Методи базирани на течна екстракција без органски растворувачи.

Постојат голем број на методи на течна екстракција што не користат органски растворувачи, туку други некои хемикалии за да ги екстрахираат липидите од остатокот на храната. Такви се методите на Babcock, Gerber и методите со детергенти.

Метода на Babcock

Овој метод е погоден за определување на липиди во млекото. Кај оваа метода, точно измерена маса на млеко се става во специјално т.н. the Babcock шише. Потоа во шишето се става сулфурна киселина и се меша со млекото. Притоа, доаѓа до хидролиза на протеините од млекото, се ослободува топлина при таа реакција, и притоа се кине глобуларната мембрана што ги обиколува капките од масните, при што доаѓа до ослободување на

липидите. Примерокот потоа се центрифугира при 55-60 °C што доведува до издвојување на липидите во грлото на Babcock шишето. Грлото на овој собирен Babcock е градуирано така што директно од скалата може да се прочита процентот на издвоените липиди. Овој метод по Babcock обично трае 45 минути и е со прецизност од 0.1%. Со овој метод не може да се определат фосфолипидите, бидејќи тие остануваат во водената фаза.

Метода по Gerber

Оваа метода е слична со методата по Babcock со таа разлика што врз примерокот млеко се става смеса од сулфурна киселина и *isoamyl alcohol*, а употребеното шише малку се разликува од тоа применето по методата на Babcock. *isoamyl* алкохолот се употребува за да се спречи јагленисувањето на шеќерите под дејство на ослобената топлина и сулфурната киселина што може да претставува проблем при определувањето на липидите според методата на Babcock. Како и кај методата според Babcock, и во овој метод не може да се определат фосфолипидите.

Методи со употреба на детергенти

Овој метод е разработен со цел да се избегне употребата на високо отровни и корозивни минерални киселини. Кај овој метод, примерокот се меша со комбинација од сурфактанти (детергенти) во т.н. Babcock шише. Овие сурфактанти ја отстрануваат глобуларната масна мембрана што ги опкружува липидните капки од млечната емулзија и придонесува тие липидни капки да се соединат и да се сепарираат. Потоа смесата се центрифугира, при што доаѓа до движење на липидите во градуираниот дел од шишето, од каде директно се отчитува нивната содржина.

5.4.4. Инструментални методи

Постојат голем број на инструментални методи што се погодни за определување на вкупната содржина на липиди во хранливи производи. Овие инструментални методи може да се поделат во три категории (i) методи што се базираат на физичко-хемиските својства на примерокот, (ii) инструменти базирани на мерење на апсорпција од зрачење; и (iii) методи базирани на одбиено зрачење.

Методи базирани на мерење на физичките својства на примерокот

- *Густина:* бидејќи густината на мастите и маслата е помала од густината на другите состојки присутни во храната, зголемувањето на содржината на масти и масла секогаш ќе биде проследено со намалување на густината на храната. Според тоа, содржината на липиди во храната може да се определи со мерење на густината на храната.
- *Електрична спроводливост:* Електричната спроводливост на липидите е многу помала во однос на спроводливоста на супстанциите што се раствораат во вода, така што зголемувањето на содржината на липидите во храната ќе биде проследено со намалување на електричната спроводливост на храната. Со мерење на електричната спроводливост на храната можно е многу прецизно да се определи и содржината на липиди во неа.

Мерења базирани на апсорпција на зрачење

- *UV-видлива:* Содржината на определени липиди може да се определи во мерење на апсорпцијата на УВ-видливо зрачење. При овие методи, липидите треба да бидат екстрахирани, да се разреда нивната концентрација и потоа да се мери апсорпцијата. Сите овие постапки ја прават оваа метода многу бавна.

- *Инфрацрвена*: овој метод се базира на апсорпција на инфрацрвената светлина IR на бранови должини од 5.73 μm што придонесува до вибрации на молекулите на липидите присутни во храната. .
- *Нуклеарна магнетна резонанца-NMR*: NMR спектроскопските методи рутински се применуваат за определување на концентрацијата на ВКУПНИТЕ липиди во храната. Содржината на липидите се определува со мерење на површината под пикот од добиеното NMR хемиско поместување што соодветствува на содржината на липидите во храната. Ова определување е исклучително брзо, трае само неколку секунди, но проблем е скапата инструментација.
- *Апсорпција на X-зраци*: Посното месо има особина во поголема мерка да апсорбира X-зраци отколку месото со поголема содржина на масти. На тој начин, како содржината на липиди во месото се зголемува, така ќе имаме намалување на апсорпцијата на X-зраците што поминуваат низ анализираниот примерок на храна. Дизајнирани се голем број на комерцијални инструменти што функционираат токму на овој феномен.

Определување на липиди базирани на методи на распрскување (одбивање) на зрачење

- *Распрскување на светлина*: Концентрацијата на мастите во разредени раствори на емулзии може да се определи со метода на распрснување на светлина бидејќи количината на распрсната светлина е директно пропорционална со количината на липиди во храната.
- *Распрскување на ултразвук*: Бидејќи распрскувањето на ултразвучните бранови е пропорционално со концентрацијата на липиди во храната, и овие методи често се употребуваат за определување на содржината на липиди во храната.

Овие инструментални методи имаат предност во однос на екстракционите техники поради тоа што се брзи, не се деструктивни, потребна е мала количина на примерок за анализа, а не е потребна скапа и долга процедура за подготовка на примеркот за анализа.

Главен недостаток кај сите калибрациони техники е што се релативно скапи и потребно е секогаш да се прават калибрациони криви. Овие техники може да се применат за анализа на липиди во храна што нема многу сложен матрикс.

5.5. Определување на составот на липидите

5.5.1. Вовед

Во претходните лекции беа разгледувани аналитички методи за мерење на вкупната содржина на липидите во храната, што не водеа сметка за природата и типот на липидите. Меѓутоа, липидите се голема и разнолика група на органски соединенија што често пати имаат различни својства. Поради тоа, многу често е потребно точно да се анализира и составот на поединечните липиди присутни во храната, а не само вкупната концентрација на липиди. Во групата на липидите спаѓаат моно-, ди- и триацил глицеридите, масните киселини, фосфолипидите, стеролите, каротеноидите, витамините А, Д Е и К и многу други. *Триацилглицеридите*, на пример, се естри на глицеролот со вишите масни киселини. Масните киселини во составот на триацилглицеридите се разликуваат по должината на нивниот липофилен ланец (опашката), а и по бројот на двојни врски во нивната структура. Така, дури и триацилглицеридите се составени од голем број на липидни компоненти од различна природа и многу често е неопходно сите тие компоненти да бидат еднозначно детектирани и точно определени. Најбитните причини поради што се определуваат липидите во храната се:

- *Законски.* Постојат законски прописи што точно кажуваат колкава концентрација на заситени, незаситени и полинезаситени липиди и холестерол мора да содржи даден хранлив производ, и тие податоци мора да стојат на етикетата од производот.
- *Квалитетот на храната.* Многу визуелни и физички својства на храната како бојата, вкусот, аромата, составот зависат од типот на липидите што се присутни во храната.

- *Оксидација на липидите.* Храната што содржи висока концентрација на незаситени липиди е многу осетлива на оксидација, при што доаѓа до појава на несакани својства кај храната како што се непријатен мирис, непожелна боја, а како споредни продукти може да се појават и голем број на токсични материи како што се некои оксиди на холестеролот.
- *Обработка на храната.* Познавањето на типот на липидите присутни во храната е битен параметар што придонесува за правилно дизајнирање на целиот процес на обработка на храната.

5.5.2. Подготовка на примерокот

Многу е важно при анализата на типот на липидите во храната земениот примерок за анализа да биде репрезентативен, и неговите својства да не се менуваат во периодот од земањето до неговото анализирање. Голем број на производи што се главно на липидна база (маслиновото масло, растителното масло и сл.) можат со многу мала подготовка директно да се анализираат. Меѓутоа, кај најголемиот број на хранливи производи потребно е најпрво да се изврши екстракција на липидите од храната и истите да се прочистат пред почетокот на аналитичката постапка. За екстракција се користат некои од методите што претходно ги разгледавме. Откако липидите ќе бидат екстрахирани, неопходно е да се изврши нивно филтрирање или центрифугирање со цел да се отстранат цврстите материи од нив. Како што рековме, многу е битно во периодот од процесот на подготовка до процесот на анализа да не дојде до промена на својствата на липидите (на пример, треба да се спречи оксидацијата на незаситените липиди). За таа цел, многу често во липидите што се подготвуваат за анализа се додаваат антиоксиданси-супстанции што ја спречуваат оксидацијата на незаситените масни киселини.

5.3. Раздвојување и анализа на липидите со хроматографски методи

Хроматографијата е една од најмоќните аналитички техники што се користат за раздвојување (сепарација) и анализирање на својствата на липидите, посебно кога е

комбинирана со нивна детекција со масена спектрометрија. При хроматографските определувања, примерокот што се анализира (растворен во соодветен растворувач) поминува низ една т.н. хроматографска колона што во својот состав содржи некоја супстанца (матрикс) што може селективно да ги задржи на својата површина молекулите што поминуваат над неа. Притоа, молекулите од различните липиди присутни во примерокот се сепарираат поради различниот афинитет на матриксот спрема нив. Колку е поголем афинитетот на матриксот од хроматографската колона спрема дадена супстанца, толку таа супстанца побавно ќе се движи низ колоната. На тој начин, различни липиди ќе може да бидат сепарирани врз база на силата на интеракција на нивните молекули со молекулите (или јоните) од матриксот што е сместен во хроматографската колона. Откако ќе бидат сепарирани во хроматографската колона, концентрацијата на сите присутни липиди во примерокот може да се определи со примена на соодветен детектор. Хроматографските методи може да се употребат за определување на целокупниот профил на различни липидни компоненти присутни во храната. Овие информации потоа може да се применат за пресметување на содржината на заситени, незаситени, полинезаситени масти и масла, холестерол, за пресметување на степенот на оксидација, за определување на староста на липидите, присуството на антиоксиданти и сл. Во поглед на хроматографските техники, треба да се нагласи дека денес постоја голем број на адекватни хроматографски техники за анализа на липидите во храната, а најважни се тенко слојна хроматографија (TLC), гасна хроматографија (GC), и високо-притисочна течна хроматографија (HPLC).

Раздвојување и определување на липиди со тенкослојна хроматографија TLC

Тенкослојната хроматографија се употребува за раздвојување и определување на содржината на голем број различни липиди присутни во храната, триглицериди, фосфолипиди, холестерол и сл. Кај оваа хроматографска техника, на соодветна плоча се нанесува соодветен материјал со апсорбентски својства и плочата се става во соодветен растворувач. Потоа на плочата се нанесува мала количина од липидот што треба да се анализира. Со текот на времето, растворувачот се движи нагоре кон плочата поради

капиларните сили, и притоа ги раздвојува различните фракции на липидите. Липидите присутни во примерокот на храна се апсорбираат со различна сила на апсорбенсот нанесен на плочата, и затоа можат да бидат раздвоени со поминувањето на растворувачот при различни времиња. На крајот се вади плочата и се прска со спреј што содржи некоја соодветна боја со цел да се направат видливи различните точки на плочата. Потоа, со споредба на поминатото растојание на примероците (како функција од времето) со соодветните растојанија на стандардни раствори може да се определи типот на липидите присутни во храната. Овие точки од липидите потоа може да бидат анализирани и квантитативно со цел да се определи концентрацијата на соодветните липиди. Оваа хроматографска техника е ефтина и се користи за брзи анализи на липидите во храната.

Определување на метил естри на масните киселини со гасна хроматографија GC

Триацилглицериди и слободните масни киселини не се многу испарливи, па тие се многу тешки за анализа со гасна хроматографија, бидејќи кај оваа техника примерокот треба да се испари во почетната фаза на инструментарната анализа. Од тие причини, овие липиди најчесто се дериватизираат пред анализата, со цел да се зголеми нивната испарливост. Триацилглицеридите најпрво се *сапунифицираат* при што се разложуваат на глицерол и на слободни виши масни киселини, а потоа тие се *метибираат*.

Триацилглицериди $\xrightarrow{\text{CH}_3\text{OH}, \text{H}_2\text{SO}_4}$ метил естри на мас. кис (FAMES) + метилиран глицерол

Со процесот на сапунификација се врши намалување на моларната маса на липидите, додека со метилирањето се намалува нивната поларност. Овие две својства доведуваат до зголемување на испарливоста на липидите. Потоа, концентрацијата на различните испарливи метил естри на дериватизирани масни киселини присутни во примерокот храна се анализираат со помош на гасна хроматографија. Овие дериватизирани масни киселини се раствораат во соодветен органски растворувач. Потоа, растворувачот што ги содржи дериватизирани масни киселини се инјектира во комората на гасниот хроматограф каде што испаруваат сите испарливи состојки и со помош на некој инертен

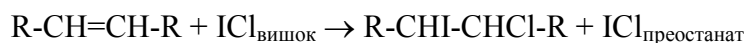
носечки гас се внесуваат во колоната за анализа. Таму различните масни киселини се раздвојуваат на апсорбенсот од колоната врз база на нивната различна маса и нивните различни поларности. На крај се врши нивна детекција и се мерат нивните концентрации.

5.5.4. Хемиски техники

Покрај инструменталните техники, разработени се и голем број на хемиски методи што служат за определување на типот на липидите присутни во храната и во маслата за јадење. Овие техники се многу поедноставни од хроматографските техники затоа што тие даваат само лимитиран достап на информации за просечните својства на липидите присутни во храната. Така, со овие техники може да се добијаат информации за просечната моларна маса, степенот на незаситеност или за содржината на масни киселини присутни во храната. И покрај тоа, тие се употребуваат во индустријата за анализа на храна во голема мерка поради тоа што се едноставни и доста евтини техники.

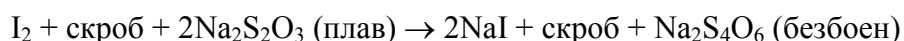
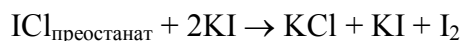
Јоден број

Јодниот број (*IV*) е мерка за просечниот *степен на незаситеност* на даден липид. Колку е поголема вредноста на јодниот број, толку е поголем бројот на C=C двојни врски во липидите присутни во примерокот. По дефиниција, јодниот број се изразува како грами на јод што се апсорбирани од маса на 100g липид. Еден од најупотребуваните методи за определување на јодниот број е т.н. "метода по Wijs". Липидот што сакаме да го анализираме се мери и се раствора во соодветен органски растворувач каде е додадена (во вишок) и позната маса на јоден хлорид ICl. Одредена количина од ICl реагира со двојните врски на незаситените масни киселини присутни во примерокот, додека вишокот додаден ICl ќе остане неизреагиран. Реакцијата се опишуба со следната шема:



Содржината од ICl што изреагирала се определува со мерење на содржината на ICl што преостанала откако реакцијата (претставена со горната реакциона шема) се

комплетирала ($ICl_{\text{изреагиран}} = ICl_{\text{вишок}} - ICl_{\text{преостанат}}$). Содржината на ICl што преостанала т.е. $ICl_{\text{преостанат}}$ се определува со додавање на вишок на калиум јодид KI во растворот што ќе ослободи елементарен јод I_2 . Потоа, ослободениот јод се титрира со раствор на натриум тиосулфат ($Na_2S_2O_3$) со позната концентрација во присуство на скроб како индикатор. Реакциите може да се претставата со следните шеми:



Скробот се додава во растворот во кој е присутен јодот и растворот станува темно син. Потоа, смесата се титрира со натриум тиосулфат и откако целата содржина на I_2 ќе биде редуцирана со I^- , тогаш растворот се обзбојува и така се определува завршната точка на титрацијата. Бројот на двојни незаситени $C=C$ врски во оригиналниот примерок потоа се определува со мерење на содржината на потрошениот натриум тиосулфат според горната равенка. Колку е поголема концентрацијата на двојните врски присутни во липидите, толку повеќе јод ќе биде апсорбиран и толку поголема ќе биде вредноста на јодниот број.

Сапунификационен број

Сапунификациониот број е мерка за просечната моларна маса на триглицеридите присутни во примерокот. Сапунификацијата е процес на разложување на неутралните глицериди до глицерол (трихидроксилан алкохол) и до масни киселини при третман на липидите со бази (алкалии) како KOH , $NaOH$ и сл:



Сапунификациониот број се дефинира како mg на KOH што се потребни за да се сапунифицира еден грам на липид. При оваа постапка, липидите најпрво се екстрахираат од храната и потоа се раствораат во етанол што содржи позната количина на KOH . Потоа

смесата се загрева за да се комплетира реакцијата. Неизрегираниот КОН потоа се определува со титрација со хлороводородна киселина со позната концентрација-HCl во присуство на соодветен индикатор. Сапунификациониот број се определува од податоците за масата на примерокот што е земен за анализа и од масата на КОН што изреагирала.

Киселински број

Киселинскиот број е мерка за *слободните киселини* присутни во дадена маса од липид. Кај постапките за определување на киселинскиот број, липидите се екстрахираат од примерокот на храна за анализа и се раствораат во етанол што содржи соодветен индикатор. Овој раствор потоа се титрира со раствор на база со позната концентрација (КОН) се до појавата на соодветно обојување, најчесто розево. Киселинскиот број се дефинира како mg на КОН што се потребни за неутрализација за масните киселини присутни во маса од 1g од липидот. Киселинскиот број може понекогаш да биде и грешно пресметан, доколку во примерокот се присутни некои супстанции со киселински својства, како аминокиселини или фосфати. Многу често, киселинскиот број е добар индикатор за процесот на разградување на триацилглицеридите при што се добиваат слободни масни киселини. Овој процес има штетни ефекти врз квалитетот на липидите.

5.5.5. Инструментални техники

Покрај овие т.н. класични техники што се користат за определување на типот и содржината на липиди, во функција се и голем број на инструментални техники. Од нив најпогодна е техниката на нуклеарната магнетна резонанца (NMR). Принципите на работа на оваа техника излегуваат од содржината предвидена во рамките на овој курс, а се работи за аналитичка техника што е екстремно скапо.

5.6. Методи за анализа на степенот на оксидација на липидите во храната

5.6.1. Вовед

Храната што содржи голема количина на незаситени липиди е посебно осетлива на оксидација. Процесите на оксидација на липидите се главни предизвикувачи на лошиот мирис на храната и на формирањето на теоксични супстанции. Оксидацијата на липидите е многу комплексен процес што е составен од голем број на хемиски и физички промени во липидите. Еве како изгледаат дел од тие процеси:

реактанти → примарни продукти → секундарни продукти

(незаситени липиди и O_2) → (пероксиди) → (конјугирани диени, кетои, алдехиди)

Денес се разработени голем број на методи за определување на степенот на оксидација на храната и за определување на типовите на липиди што можат да бидат подложни на оксидација.

5.6.2. Хроматографија

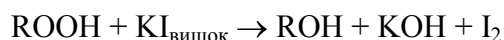
Хроматографијата е една од најупотребуваните техники за определување на степенот на оксидација на липидите, бидејќи со хроматографските техники може да се добие детална слика за супстанците (липидите) присутни во храната. Притоа, со употреба на масен детектор може многу лесно да се следат и природата и количината на секундарните продукти на процесите на оксидација на липидите (алдехидите, кетоните и сл) и да се добијаат информации за типот и содржината на липиди што се оксидирале.

5.6.3. Содржина на конзумиран кислород

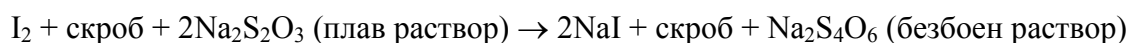
Процесот на оксидација на липидите зависи од реакцијата на незаситените липиди со кислородот. Според тоа, можно е да се следи процесот на оксидација на липидите со мерење на содржината на кислород во системот. При овие методи, липидот се става во запечатен контејнер, а притоа се мери содржината на кислород што се конзумира (апсорбира) од страна на примерокот од таа количина на кислород што е пуштена да тече над примерокот за анализа. Колку е поголема содржината на кислород што се пушта во единица време во контејнерот, толку е поголема неговата конзумација од страна на примерокот, а со тоа е побрз и процесот на оксидација на липидите.

5.6.4. Пероксиден број

Пероксидите се соединенија што имаат општа формула R-OOH, и тие се примарни продукти што се формираат при реакциите на оксидација на липидите. Според тоа, нивната детекција ни дава информации за прогресот на процесот на оксидација на липидите. Еден од најчестите методи што се користат за определување на пероксидниот број се базира на способноста на пероксидите да ослободат елементарен јод при нивна реакција со KI. Најпрво липидот се раствора во соодветен органски растворувач што содржи вишок на KI:



Откако реакцијата ќе се комплетира, тогаш содржината на пероксидите ROOH што изреагирала може да се определи индиректно преку содржината на формиран елементарен јод. Содржината на ослободен јод се определува со титрација со натриум тиосулфат во присуство на скроб како индиктаор:



Содржината на $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ што се троши за титрација при горната реакција е директно пропорционална со концентрацијата на пероксидите во храната. Овој метод иако е едноставен, сепак не е доволно веродостоен. Тоа е од причина по тоа што пероксидите се примарни продукти на оксидацијата на липидите, а тие во понатамошната фаза се претвораат во секундарни продукти (кетони, алдехиди). Според тоа, доколку се определи мала вредност на пероксидниот број, тоа може да биде индикатор дека реакцијата на оксидација на липидите е на почеток, но може да биде и индикатор дека пероксидите веќе почнале да се претвораат во секундарни продукти, т.е. дека реакцијата на оксидација на липидите е веќе во напредна фаза. Со овој метод не може недвосмислено да се потврди во каква фаза е процесот на липидна оксидација.

5.6.5. Конјугирани диени

Речиси веднаш откако пероксидите ќе бидат формирани при реакцијата на оксидација на липидите, тогаш неконјугираните двојни врски ($\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{C}=\text{C}$) што се присутни во природните незаситени липиди се конвертираат во конјугирани двојни врски ($\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$). Конјугираните диени апсорбираат UV зрачење на 233nm, додека конјугираните триени ($\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{C}=\text{C}$) апсорбираат UV зрачење на 268nm. На тој начин, процесот на оксидација на липидите може да се следи со растворање на липидите во соодветен растворувач и со мерење на апсорбанцата со текот на времето со употреба на UV-видлив спектрофотометар. Во понатамошните фази од процесот на оксидација, конјугираните диени (тие се примарни продукти на оксидацијата) се претвораат во секундарни продукти што не апсорбираат интензивно UV-видливо зрачење. Тоа доведува до намалување на апсорпцијата што е предизвикана од конјугираните диени. Тоа значи дека овој метод е погоден за следење на процесот на оксидација на липидите во раната фаза на оксидацијата.

5.6.6. Тиобарбитурна киселина (ТВА)

Определувањето по методот на тиобарбитурната киселина е еден од најверодостојните тестови што се користи за определување на степенот на оксидација на липидите. Овој метод се базира на реакција на алдехидите што се формираат како секундарни продукти при оксидацијата на липидите со тиобарбитурна киселина, при што како продукт се добива комплексно соединение што е розево обоено. Со мерење на апсорбанцата на добиениот комплекс директно може да се определи степенот на оксидација на липидите.

5.6.7. Оксидациски тестови

Наместо да се определува степенот на оксидација, многу често кај липидите се применува вештачки предизвикана оксидација. Кај овој метод, во сад каде се наоѓаат липиди екстрахирани од храна се внесува кислород од надвор и паралелно се мери концентрацијата на секундарните продукти со текот на времето со соодветна метода (хроматографска најчесто). На тој начин се знае во кој временски интервал отпочнува оксидацијата на липидите.

5.7. *Определување на физичко-хемиските својства на липидите*

5.7.1. Вовед

Не само поради нивната хранлива вредност, липидите се додаваат во храната и поради други особини како што се вкусот во устата, агрегатната состојба, аромата и сл. Липидите се употребуваат и како супстанции што пренесуваат топлина за време на подготовката на храната. Поради сите овие примени, важно е да се анализираат и физичко-хемиските својства на липидите.

5.7.2. Содржина на цврсти масти

Содржината на цврсти масти (SFC) во храната влијае врз многу од сензорните карактеристики и физичките својства на храната како што се флексибилноста, вкусот во

устата, стабилноста и сл. Производителите на храна често ги мерат варијациите во содржината на цврсти масти како функција од температурата при карактеризацијата на липидите што се употребуваат во некои храни (како маргарините и путерите). Содржината на цврсти масти се дефинира како процентот на вкупни липиди што е во цврста агрегатна состојба на дадена температура т.е. $SFC = 100M_{\text{solid}}/M_{\text{total}}$, каде M_{solid} е масата на цврсти липиди, а M_{total} вкупната маса на сите липиди во храната.

Познати се голем број на методи за определување на температурната зависност на содржината на цврстите масти во храната. Густината на цврстите липиди е поголема од таа на течните липиди. Тоа значи дека ќе дојде до зголемување на густината кога липидите ќе кристализираат, а ќе дојде до намалување на густината кога липидите од цврста состојба ќе преминат во течна. Со мерење на густината на липидите при поголем ранг на температури возможно е да се определи содржината на цврсти масти како функција од температурата со примена на следната равенка:

$$SFC = \frac{(\rho - \rho_L)}{(\rho_S - \rho_L)} \times 100$$

каде ρ е густината на липидот на дадена температура, а ρ_L и ρ_S се густините на липидите кога тоа е целосно во течна и целосно во цврста агрегатна состојба, соодветно, на истата температурае. Густината обично се мери со специјални шишиња за мерење на густината или со т.н. дилатометри. Во поново време овие мерења се вршат со нуклеарна магнетна резонанца, бидејќи мерењата со оваа техника се многу попрецизни и побрзи.

5.7.3. Температура (точка) на топење

Температурата на топење е важна физичка величина што укажува на содржината на липидите во храната. Постојат повеќе начини на изразување на температурата на топење и обично тоа се едноставни експерименти.

5.7.4. Температура на замаглување

Оваа е температурата при која течното масло почнува да кристализира. Липидот од храната се загрева на температура каде се знае дека сите кристали почнуваат да се топат (*e.g.*, 130 °C). Потоа примерокот се лади и се определува температурата на која што почнува заматувањето пред да почне кристализацијата на маста. Од практична гледна точка многу е важно маслата да не се стврдуваат при ниски температури, на пример при нивно скалдирање на 0 °C.

5.7.7. Реологија на липидите

Реолошките својства на липидите се многу битни за својствата на храната. Реологијата е наука што се занимава со деформацијата и течењето на материјалите. При испитувањето на реолошките својства, се принесува сила од наговор врз испитуваниот материјал, а потоа се мерат промените што настануваат во неговата форма или можноста за негово втечнување. Стабилноста на храната во голема мерка зависи од реолошките својства и затоа е пожелно да се знаат и тие параметри кај липидите. Постојат голем број на методи за определување на реолошките својства на липдите. Од реолошките својства, често се определува пластичноста на храната што е мерка за потенцијалот за ширење на храната.

6. *Анализа на протеини*

6.1 Вовед

Протеините се полимери изградени од аминокиселини. Во структурата на протеините се вклучени 20 различни аминокиселини. Протеините се разликуваат помеѓу себе според типот, бројот и секвенцата на аминокиселините што влегуваат во нивниот состав. Како резултат на тоа, протеините имаат различна форма, структура и различни функции. Протеините се едни од најбитните состојки во храната поради голем број на причини. Тие се еден од главните извори на енергија, а тие се и извор на есенцијални аминокиселини како lysine, tryptophan, methionine, leucine, isoleucine и valine што се неопходни за здравјето кај луѓето. Протеините се главни структурни компоненти во голем број на хранливи производи и тие често пати го определуваат составот и надворешните особини на голем број од производите. Многу често во храната се додаваат и изолирани протеини што имаат за цел да им дадат на производите посакувана боја, состав или стабилност. Протеините најчесто се употребуваат како емулгатори, згуснувачи и сл. При анализата на храната потребно е да се определи вкупната содржина на протеини, меѓутоа битно е да се знае и молекуларната структура и функционалните својства на поодделните класи на протеини присутни во даден хранлив производ.

6.2. *Определување на вкупната содржина на протеини*

6.2.1. Метода според „Kjeldahl,,

Методата според Kjeldahl е развиена уште во 1883 од производителот на пиво Johann Kjeldahl. Кај оваа метода, примерокот од храна се подложува на вриење во присуство на силна минерална киселина, при што ослободениот азот се определува со соодветна техника на титрација. Содржината на протеини во храната потоа се пресметува врз база на концентрацијата на определениот азот. Основните принципи на овој метод се применуваат и денес, иако се воведени и голем број на модификации со цел да се подобри

и да се забрза целата постапка. Бидејќи со методата на Kjeldahl не може директно да се пресмета концентрацијата на протеините, при пресметките се употребува *фактор на конверзија (F)* со цел да се претвори концентрацијата на измерениот азот во концентрација на протеини. Факторот на конверзија од 6.25 (што соодветствува на маса од 0.16 g азот на 1 gram протеин) се користи при голем број на апликации. Меѓутоа, тоа е само просечна вредност на овој фактор за конверзија, бидејќи голем број на протеини имаат различни фактори на конверзија што зависи пред се од типот на аминокиселини присутни во нивниот состав. Методот според Kjeldahl може да се подели во три сегменти: дигестија (вриење), неутрализација и титрација.

6.2.1.1. Принципи на методата според „Kjeldahl,,

Дигестија

Примерокот на храна што треба да се анализира се вага и се става во *сад за дигестија* и потоа се врие во присуство на сулфурна киселина, ахидрид на натриум сулфат (има улога да ја забрза реакцијата со покачување на температурата на вриење на храната) и катализатор како бакар, селен, титан или жива. При вриењето (дигестијата) доаѓа до претворање на азотот од органскиот дел од храната (а не и на азотот што е форма на нитрати или нитрити, т.е. „неорганскиот,, азот) во форма на амонијак. Споредни продукти при процесот на дигестија се CO_2 и H_2O што доаѓаат од оксидацијата на органските компоненти. Амонијакот што се добива при процесот на дигестија не се ослободува од киселиот раствор каде се врши дигестијата поради тоа што амонијакот е во форма на амониум јон (NH_4^+) што се врзува со сулфатните јони (SO_4^{2-}) од растворот и притоа гради амониум сулфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, и во таа форма азотот останува во растворот во кој се врши дигестијата:

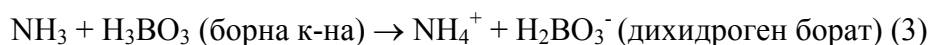


Неутрализација

Откако ќе заврши процесот на дигестија (нема повеќе гасови да излегуваат од садот што врие), тогаш садот за дигестија се поврзува со туба во т.н. *сад приемник*. Растворот од садот за дигестија потоа се третира со база, средината се прави алкална со додавање на вишок на натриум хидроксид, при што од амониум сулфатот $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ се добива гас амонијак:

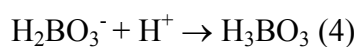


Формираниот амонијак (гас) при оваа реакција се ослободува од садот за дигестија и преку цевката оди во приемниот сад. Во приемниот сад има раствор од борна киселина. Во приемниот сад амонијакот се претвора во амониум јон NH_4^+ , а притоа борната киселина се претвора во дихидроген боратен јон H_2BO_3^- :



Титрација

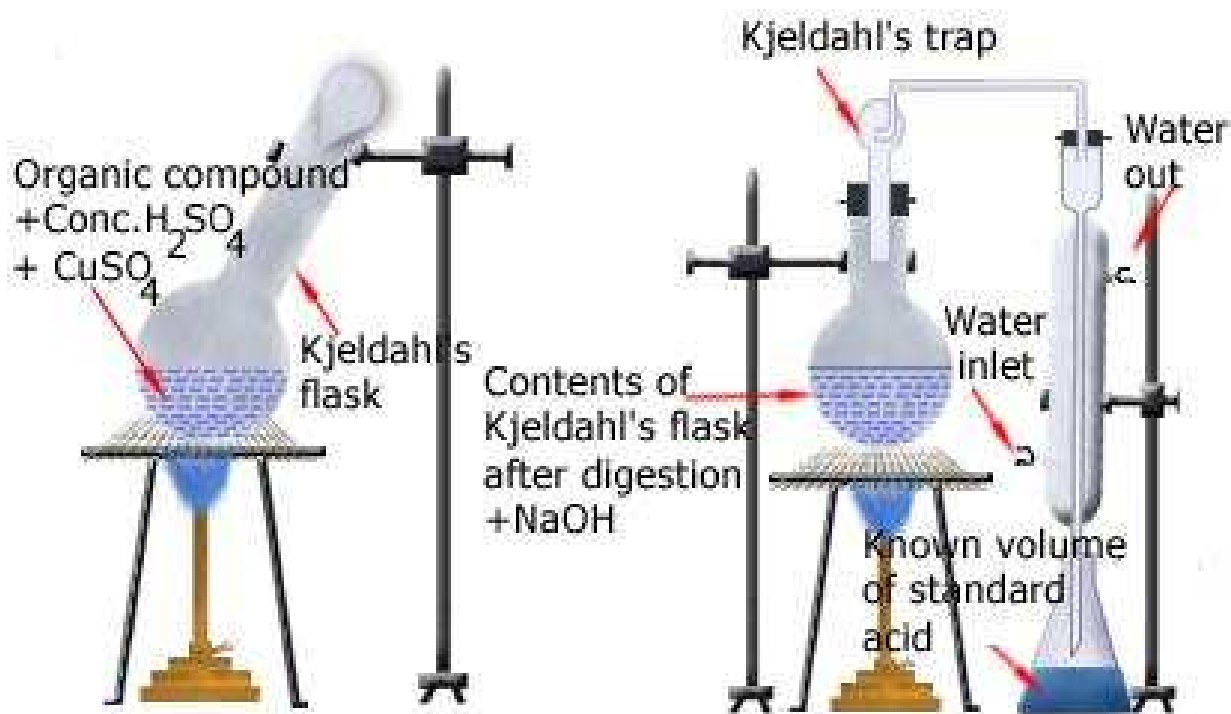
Содржината на азот се пресметува преку титрација на формираниот амониум борат со стандарден раствор од сулфурна или хлороводородна киселина, со употреба на соодветен индикатор.



Концентрацијата на водородните јони (изразена во молови) што е неопходна да се добие завршната точка на титрација е еднаква на концентрацијата на азотот што се наоѓал во оригиналниот примерок од храната земен за анализа (види ја равенката 3). За определување на концентрацијата на азот во примерок земен за анализа со маса m може да се употреби следната формула grams со употреба на $x\text{M}$ HCl раствор ($x\text{M}$ е моларна концентрација) на хлороводородна киселина за титрација:

$$\% N = \frac{x \text{ moles}}{1000 \text{ cm}^3} \times \frac{(v_s - v_b) \text{ cm}^3}{mg} \times \frac{14 \text{ g}}{\text{moles}} \times 100 \quad (5)$$

Во овој израз, v_s и v_b се титрационите волумени на примерокот и на „слепата проба,, а термот 14 g/moles е моларната маса на азотот N. Слепата проба обично се обработува на ист начин и паралелно со примерокот со цел да се избегне азотот што евентуално преку реагенсите би дошол во примерокот за анализа, а тоа би довело до повисока концентрација на азот во примерокот. Откако ќе се пресмета содржината на азот, со примена на соодветен фактор на конверзија F таа содржина на азот се претвора во содржина на протеин според формулата $\% \text{Protein} = F \times \%N$.



Шематски приказ на методата за определување на содржината на протеини според „Kjeldahl“

6.2.1.4. Предности и недостатоци на методата според Kjeldahl

Предности. Методата според Kjeldahl е интернационално призната метода и широко се применува за определување на протеините во примероци од органско потекло. Методата е релативно едноставна и рутински се применува во секоја анализа.

Недостатоци. Методата според Kjeldahl не дава податоци за вистинската концентрација на протеините во храната, бидејќи со неа се определува целокупниот органски азот (а не само тој што е во протеините). Притоа, за различни протеини потребни се различни фактори на конверзија. Употребата на сулфурна киселина при високи температури е доста опасно за изведувачите на експериментите. Техниката се изведува прилично долго. Згодно е ДА СЕ НАЈДАТ ИНФОРМАЦИИ ЗА СКАНДАЛИТЕ СО СУПСТАНЦАТА МЕЛАМИН што се употребува за вештачко „збогатување„ на млекото со протеини и да се изработи семинарска работа за тоа.

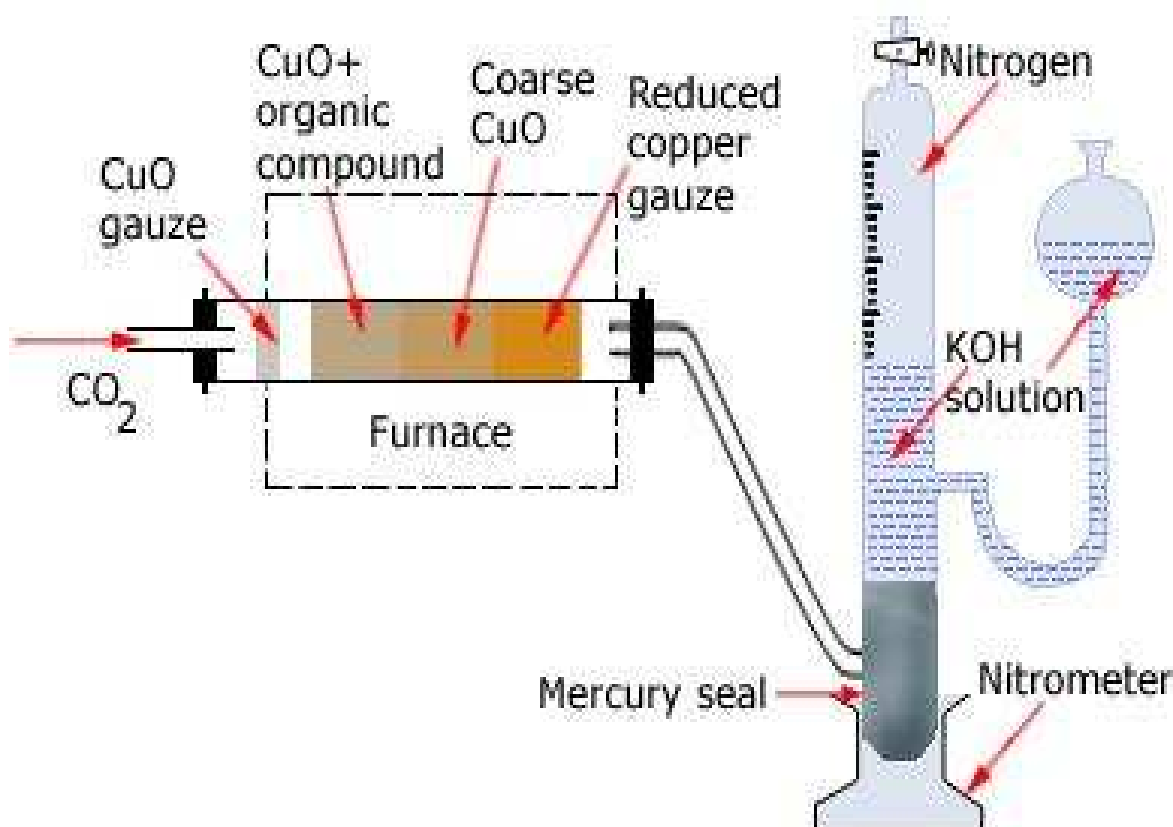
6.2.2. Метода според Dumas

Неодамна е развиена автоматизирана инструментална техника што е способна да даде податоци за содржината на протеини во храната во релативно кратко време. Техниката е базирана на методот на научникот Dumas стара повеќе од 60 години. Оваа метода веќе почнува да ја истиснува методата наспореде Kjeldahl пред се поради значително поголемата брзина.

6.2.2.1. Општи принципи на методата според Dumas

Примерок за анализа со позната маса се спалува во печка во присуство на кислород при високи температури (околу 900 °C). Притоа доаѓа до ослободување на CO₂, H₂O и N₂. Испуштените гасови CO₂ и H₂O се отстрануваат со поминување на гасовите низ специјална колона каде истите се апсорбираат. Содржината на азот потоа се определува со поминување на гасовите преку колона што има детектор за термичка спроводливост на својот крај. Оваа колона помага во отстранувањето на резидуите од CO₂ и H₂O што

евентуално преостанале при протокот на смесата од гасовите низ првобитната колона. Инструментот се калибрира со анализа на материјал што е чист и каде се знае колкава е концентрацијата на азот во него, таков материјал е на пример EDTA (= 9.59%N). На тој начин, сигналот од термалниот спроводник може да се претвори во содржина на азот. И кај овој метод, како и кај методата според Kjeldahl неопходно е да се направи конверзија на содржината на азот во содржина на протеини со употреба на соодветни фактори на конверзија.



Шематски приказ на методата за определување на содржината на протеини според „Dumas“

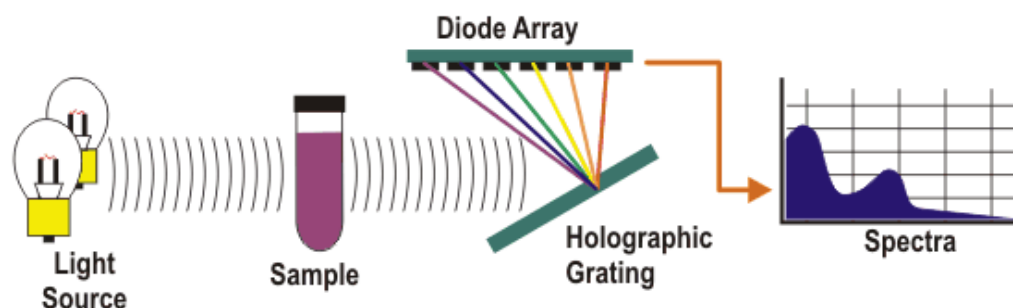
6.2.2.2. Предности и недостатоци

Предности: Многу е побрза од методата според Kjeldahl (околу 4 min по мерење, во споредба со 1-2 h потребни за методот според Kjeldahl). Не се употребуваат опасни хемикалии и катализатори. Лесна е за употреба, а овозможува повеќе примероци да се анализираат симултано и автоматски.

Недостатоци: Високи трошоци за инструментацијата. Не е релевантна за вистинската содржина на протеините, бидејќи сите непротеински органски компоненти што содржат азот во својот состав ќе придонесат да се определи привидна поголема концентрација на протеини во примерокот.

6.2.3. Методи со примена на UV-видлива спектроскопија

Денес се познати голем број на методи за определување на содржината на протеини во храната што се базирани на мерења со UV-видлива спектроскопија. Овие методи главно се базирани на природната способност на протеините за апсорбираат (или да рефлектираат) зрачење во UV-видливиот регион од електромагнетниот спектар, но постојат и модифицирани методи што се базираат на хемиска реакција на протеините, при што тие се претвораат во форма што може да апсорбира UV зрачење. Кај овие методи, најпрво се конструира калибрациона крива со примена на протеини со позната концентрација (стандардни раствори). Потоа се мери апсорбанцата на растворот од анализираниот примерок од храната на иста бранова должина како и при конструирањето на калибрационата крива, а концентрацијата на протеинот во примерокот се отчитува од калибрационата крива. Познати се голем број на методи за определување на содржината на протеини со примена на UV-видлива спектроскопија, а некои од нив се дадени подолу.



Шематски приказ на UV-VIS спектроскопско определување на протеини

6.2.3.1. Директни мерења на бранови должини од 280nm

Tryptophan и tyrosine се аминокиселини што интензивно апсорбираат ултравиолетово зрачење на 280 nm. Содржината на tryptophan и tyrosine кај голем број на протеини е константна, па така апсорпцијата на протеините на 280nm може да се користи за определување на нивната содржина во храната. Предностите кај оваа метода се гледаат во едноставниот приод, а главен недостаток е тоа што и нуклеинските киселини интензивно апсорбираат на 280 nm и може да интерферираат при мерењето на протеините.

Метод според Biuret

Кога Cu^{2+} јоните стапат во интеракција со *пептидните врски* во алкална средина, тогаш се добива интензивно виолетово обојување на растворите. Таканаречениот „biuret реагенс“, што ги содржи сите компоненти неопходни за анализата на протеините може да се набави комерцијално, и тој се меша со растворот каде се присутни протеините и се чека 15-30 min пред да се отчита апсорбанцата од УВ-видливиот спектроскоп на 540 nm. Оваа метода има помала осетливост во поглед на другите UV-видливо спектроскопски методи.

Метод според Lowry

Овој метод ги комбинира реагенсите од методот според biuret со други реагенси (т.н. Folin-Ciocalteu phenol реагенси) што реагираат со аминокиселините *tyrosine* и

tryptophan од протеините. Тоа доведува до појава на сина боја што потоа може да се детектира со отчитување на апсорбанцата на 500 - 750 nm. Овој метод е посензитивен на ниски концентрации на протеини во споредба со методот според biuret.

Турбидиметриски метод

Молекулите од протеините што се растворливи во раствори може да се преведат во форма на талог (да се исталожат) со употреба на соодветен хемиски реагенс. Процесот на исталожување на протеините придонесува да појава на турбидност (замаглување, заматување) во растворот. На тој начин, со мерење на степенот на заматување на растворот може да се определи концентрацијата на протеините во примерокот

6.2.3.2. Предности и недостатоци

Предности: UV-visible техниките се прилично брзи, едноставни и сензитивни на ниски концентрации на протеини.

Недостатоци: Во најголем дел од UV-visible техниките потребно е да се употребуваат разредени и транспарентни раствори што не содржат супстанции што би можеле да апсорбираат или рефлектираат зрачење на брановите должини каде што апсорбираат (или рефлектираат) протеините што се анализираат. Тоа придонесува за внимателна и сензитивна постапка за подготовка на примеркот за анализа, пример хомогенизација, екстракција, центрифугација, филтрација и сл. што може да одземе долго време во текот на анализата. Притоа, апсорбанцата зависи и од концентрацијата на анализираниот протеин, така што протеини со различна аминокиселинска секвенца ќе апсорбираат зрачење во различен степен.

6.2.4. Други инструментални техники

Постојат голем број на различни инструментални техники што се употребуваат за определување на вкупната содржина на протеини во храната. Според принципите на функционирање, овие техники може да се поделат во три групи: (i) техники базирани на мерење на генералните физички особини, (ii) техники базирани на мерење на апсорпција или радијација на зрачење и (iii) техники базирани на одбивање на зрачење.

6.2.4.1. Техники базирани на мерење на физичките особини

- *Густина:* Густината на протеините е поголема од густината на останатите компоненти од храната, така што со зголемување на содржината на протеини секогаш доаѓа до зголемување на густината на храната. Така, со мерење на густината на храната може да се определи (грубо) и содржината на протеините во храната.
- *Индекс на рефракција:* Зголемувањето на индексот на рефракција на водените раствори е секогаш пропорционален со зголемувањето на содржината на протеините во примерокот. Според тоа, мерењата базирани на индексот на рефракција може да се применат за определување на содржината на протеините во храната.

Техники базирани на мерење на апсорпција на зрачење

- *UV-видлива спектроскопија:* Овие техники се разработени во поглавјата претходно.
- *Нуклеарно магнетна резонанца NMR:* NMR спектроскопијата може да се употреби за определување на вкупната содржина на протеини во храната со мерење на површината на пиковите во NMR спектарот што се добиваат од резонанцијата на протеините, меѓутоа овие техники се многу скапи.

Техники базирани на мерење на одбивање на зрачење

- Кога во протеинот има протеини во форма на агрегати (коагулати), тогаш со примена на техники на распрскување на светлосно или ултразвучно зрачење може да се определи нивната содржина.

6.2.4.2. Предности и недостатоци

Главните предности на овие методи се гледа во тоа што тие не се деструктивни, релативно се брзи и доста прецизни. Главен недостаток кај овие техники е фактот што секогаш мора да се конструира калибрациона крива со употреба на стандардни раствори со позната концентрација на протеини. Овие методи може да се употребуваат за анализа на протеините кај хранливи производи што имаат релативно едноставен состав, додека кај производи што се со комплексен состав овие методи не се применливи.

6.3. Раздвојување и карактеризација на протеините

Во претходните лекции беа дискутирани методи за определување на *вкупната концентрација* на протеините во храната. Меѓутоа, аналитичарите многу често се заинтересирани за определување на *типот и природата* на протеините присутни во храната. Тоа е од причина што секој протеин има специфични својства. Типот на протеините обично се определува со изолација и сепарација на протеините од комплексната протеинска смеса, а потоа може да се премини кон нивна карактеризација. Протеините најчесто се сепарираат врз база на разликите во нивните физичко-хемиски својства како големината, полнежот, апсорпцијата, растворливоста и резистентноста на топлина. Изборот на техника за сепарација на протеините зависи од голем број на фактори како што се причините поради кои се врши анализата, големината на примерокот за анализа, посакуваниот степен на чистота, расположливата инструментација, типот на протеините што треба да се раздвојуваат, како и од цената на чинење на целата постапка. Многу е битно при овие анализи да се знае како надворешните и експерименталните

услови (пр., pH, јонската сила, растворувачот, температурата и сл.), влијаат на структурата и својствата на протеините. Тоа е значајно за да се применат соодветни услови за издвојување на даден протеин од некоја протеинска смеса.

6.3.1. Методи што се базираат на различната растворливост на протеините

Протеините може да се раздвојат од дадена протеинска смеса врз база на нивната различна растворливост во вода. Растворливоста на протеините во вода се базира првенствено на типот на аминокиселините од кои тој протеин е изграден, и на аминокиселинската секвенца во составот на протеинот. Аминокиселинската секвенца влијае врз големината, формата, хидрофобноста и електричниот полнеж на протеините. Овие сепарациони техники се едноставни при раздвојување од големи примероци од храна, затоа што се релативно брзи. Обично овие техники се прв чекор и се претходница за останатите техники што се применуваат за попрецизно раздвојување на протеините.

Таложeње

Протеините можат да бидат исталожени од водените раствори кога во растворот се додадат соли чија содржина надминува одредена критична вредност. Овие методи се познати под поимот „иссолување“, бидејќи кај нив водата од растворот се ангажира за да стапува во интеракции со солите, а и не може да биде достапна за да ги обиколува (хидратира) протеините. Амониум сулфат $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ е сол што често се употребува кај овие методи поради тоа што има голема растворливост во вода. Често се користат и други соли како NaCl или KCl. Со цел процесот на сепарација на протеините да биде ефикасен, обично целата техника се изведува во два чекори. Во првиот чекор се додава сол во концентрација што е малку пониска од таа што е неопходна за преципитација на протеините што се од интерес. Потоа растворот се центрифугира со цел да се отстранат протеините што се помалку растворливи од протеинот што ни е од интерес. Потоа се зголемува концентрацијата на солта во растворот до степен што е доволен за целосна

преципитација на протеините што ни се од интерес и тие протеини се одвојуваат од растворот со центрифугирање.

Изоелектрично таложење (изоелектрична преципитација)

Под терминот изоелектрична точка (pI) кај даден протеин се подразбира рН вредноста кај водениот раствор кога вкупниот полнеж во составот на протеинот е нула. При рН вредност еднаква на изоелектричната точка протеините имаат тенденција да се исталожат, бидејќи тогаш отсутствуют електростатските сили што ги држат одвоени една од друга молекулите на протеините. Различни типови на протеини имаат различни изоелектрични точки поради различните аминокиселини што се присутни во нивниот состав. Така, кога рН вредноста во водениот раствор се прилагоди да биде еднаква со pI вредноста на даден протеин, тогаш ќе дојде до исталожување само на тој протеин, додека другите протеини ќе останат растворени во водениот раствор и на тој начин ќе се изврши сепарација на протеините.

Денатурација на „контаминиращки„ протеини

Голем број на протеини може да се исталожат од раствор кога ќе бидат загреани над некоја температура, или со поддесување на рН или киселоста на растворот. Притоа, протеините што се стабилни на дадени високи температури, или се имуни на кисели или базни средини ќе останат во растворот, додека останатите т.н. „контаминиращки„ протеини што не ни се од интерес ќе се исталожат во растворот.

6.3.2. Раздвојување на протеините базирани на различен афинитет за апсорпција

Апсорпционата хроматографија е техника што се користи за сепарација на протеини што се базира на различен степен на апсорпција-десорпција на различните протеини врз површината од некој цврст материјал врз кој смесата од протеини се пушта да помине. Такви техники се *афинитетната и јоно-изменувачката хроматографија*.

Сепарацијата на протеините со овие техники моѓе да се изведи со примена на отворена колона или со високо притисочна течна хроматографија.

Јоно-изменувачка хроматографија (Ion Exchange Chromatography)

Оваа техника се базира на реверзибилна апсорпција-десорпција на јоните од растворот што поминуваат врз носач на кој е нанесен некој полимер што има полнеж на својата површина. Така, цврстиот полимер што има позитивни полнежи на својата површина се нарекува *анјонски изменувач*, бидејќи тој ги врзува негативните јони (анјоните), додека пак цврстиот полимер што има негативни полнежи на својата површина се нарекува *катјонски изменувач* бидејќи тој ги врзува позитивните јони (катјоните) на својата површина. Кај оваа техника треба да се поддесат условите во пуферот (рН и јонската сила) со цел да се добие максимално поврзување на протеинот што е од интерес врз површината на јонскиот изменувач. Оние протеини што не ни се од интерес ќе имаат послаби интеракции со изменувачот и тие први ќе поминат низ колоната, додека другите што ни се од интерес ќе се задржат подолго време поради силните интеракции со јоните од изменувачот.

Афинитетна хроматографија

Кај оваа техника постои стационарна фаза што се состои од ЛИГАНД што е ковалентно поврзан на цврст носач. Лигандот е некој материјал чии молекули имаат специфични селективни и реверзибилни афинитети во поврзувањето со даден протеин. Примеркот што треба да се анализира поминува низ колона и притоа протеинот од интерес ковалентно се поврзува за лигандот од стационарната фаза, додека другите протеини што не се од интерес поминуваат низ колоната без да се задржат на неа. Потоа, протеинот што е од интерес се отстранува од стационарната фаза со пропуштање на соодветен растворувач. Ова е една од најефикасните техники за раздвојување на протеини што се користи при анализата на протеините во храната. Недостаток на овие техники е што се релативно скапи.

6.3.3. Раздвојување на протеините базирано на различната големина на молекулите

Протеините може да бидат сепарирани и врз база на нивната различна големина. Најчесто овие техники се применуваат за протеините чија молекулска маса е во рангот помеѓу 10,000 и 1,000,000 далтони. Во пракса, успешната сепарација на протеините со овие методи зависи од т.н. *Stokes-ов радиус* на протеинот, а не директно од моларната маса на протеините. Stokes-овиот радиус е просечниот радиус што протеинот го има кога е во воден раствор, а неговата вредност зависи од тридимензионалната структура на протеинот.

Дијализа

Дијализата се употребува за сепарација на молекули што се наоѓаат во раствор со примена на ПОЛУПРОПУСТЛИВА МЕМБРАНА. Оваа мембрана овозможува низ неа да поминат помалите молекули, додека таа не ги пропушта поголемите молекули да поминат низ неа. Растворот што ги содржи протеините се става во цевка за дијализа што потоа се запечатува, и потоа се става во голем волумен на сад исполнет со вода или со некој пуфер што се нежно се меша. Притоа, преку мембраната доаѓа до трансфер на малите молекули од протеинскиот раствор, додека протеините остануваат во садот каде првобитно биле растворени. Дијализата е процес што трае доста долго, обично околу 12 часа и тоа е голем недостаток кај оваа техника.

Ултрафилтрација

Растворот што ги содржи растворените протеини се става во келија што содржи *полупропустлива мембрана*, а потоа се нанесува притисок. Притоа, помалите молекули поминуваат низ мембрана, додека поголемите молекули остануваат во растворот. Оваа техника е значи слична на дијализата, но поради употребата на надворешен притисок, оваа техника е значително побрза од дијализата. Ултрафилтрацијата се користи за концентрација на протеините во растворот, како и за отстранување на солите и другите помали молекули од растворот каде што се присутни протеините.

Ексклузиона хроматографија

И оваа техника (понекогаш позната и под името „гел филтрација,“) се употребува за сепарација на протеините врз база на нивната различна големина. Кај оваа метода, растворот што ги содржи протеините се пропушта низ колона што содржи порозна стационарна фаза направена од некој мрежно поврзан полимер (како dextran или agarose). Притоа, протеините чија големина е поголема од големината на порите на стационарната фаза поминуваат низ колоната без да се задржат на неа, додека движењето на молекулите на протеините што можат да навлезат во порите на гелот е значително забавено. Притоа, молекулите од протеините се елуираат од колоната систематски врз база на нивната големина.

6.3.4. Раздвојување на протеините со електрофореза

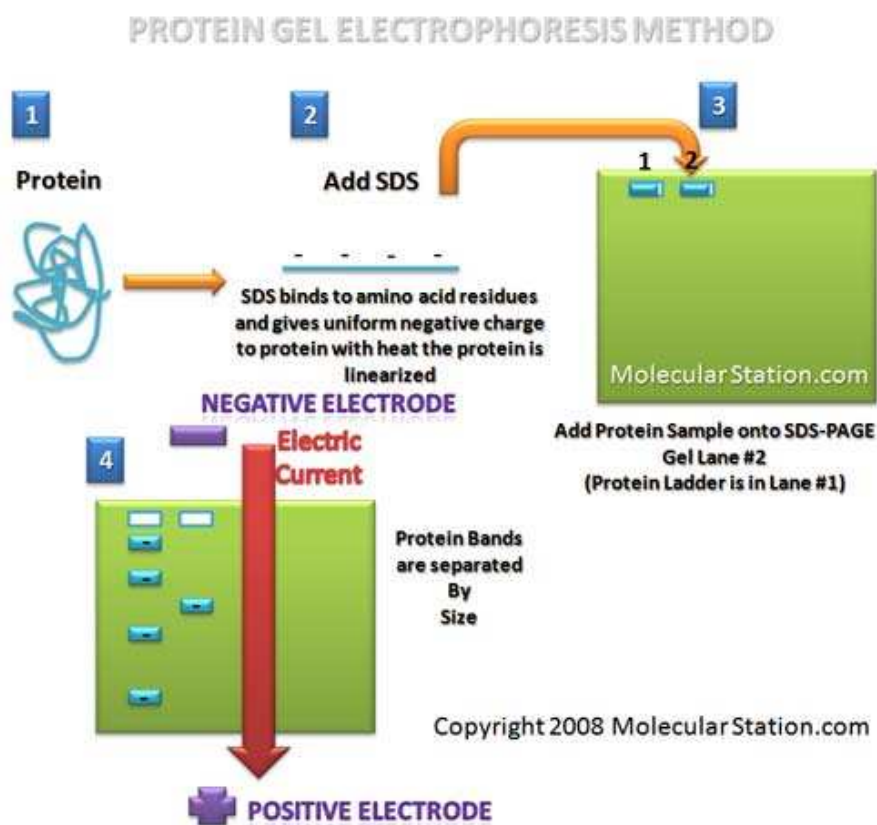
Електрофорезата е техника што се базира на разликите во миграцијата (движењето под дејство на електрично поле) на молекули што имаат полнеж во својот состав, при примена на електрично поле врз растворот каде протеините се растворени. Оваа техника може да се употреби за сепарација на протеини врз база на нивната големина, форма или полнеж.

Не-денатурирачка електрофореза

Кај оваа техника, растворот што ги содржи протеините се истура врз површината на некој порозен гел (најчесто тоа е polyacrylamide, скроб или агар-агар) и потоа се нанесува електричен потенцијал низ гелот. Притоа, протеините се движат низ гелот во насока што зависи од нивниот полнеж што го носат. Брзината на нивното движење (или мобилноста) зависи од големината на полнежот (дали е 1+, 2+, 5+, 2-, 3- и т.н.) и од фрикцијата (сила што се противи на движењето на цврстите тела) при нивното движење и е дадена со следниот израз:

$$\text{mobility} = \frac{\text{applied voltage} \times \text{molecular charge}}{\text{molecular friction}}$$

Како што видовме претходно, при дадена вредност на рН на растворот протеините можат да бидат позитивно или негативно набиени што зависи од вредноста на нивната изоелектрична точка (pI). Кога вредноста на рН на растворот е поголема од pI вредноста на протеинот, тогаш тој протеин е негативно набиен при таа вредност на рН, додека при рН на растворот е помал од pI на протеинот, тогаш протеинот е позитивно набиен (носи позитивен полнеж на својата структура). Големината на полнежот што го носат протеините и големината на нанесениот потенцијал се факторите што определуваат колку далеку ќе се се придвижат протеините со текот на времето.



Шематски приказ на процесите на електрофореза за сепарација на аминокиселини

Денатурирачка електрофореза

Кај оваа техника протеините се сепарираат првенствено врз база на нивната различна моларна маса. На почетокот на анализата, протеините најпрво се денатурираат со додавање на алкохол (mercaptoethanol). Овој алкохол има способност да ги раскине дисулфидните врски во структурата на протеините. Во системот се довава и натриум *додецил сулфат* (SDS) (што е анјонски сурфактант), кој со хидрофобни интеракции се врзува за протеинот и притоа доаѓа до одвиткување (одмоткување) на протениските молекули како резултат на одбивни интеракции поради негативниот полнеж на сурфактантот и негативните полнежи што ги носат протеините. Притоа, доаѓа до движење на протеините низ мрежно поврзаниот полимер (т.е. стационарната фаза во колоната). На тој начин протеините се разводјуваат врз база на нивната моларна маса, затоа што брзината на нивното движење зависи од нивната големина во однос на големината на порите на полимерот од стационарната фаза. Така, помалите протеини се движат побрзо низ стационарната фаза одошто големите протеини.

За да се определи колку далеку се придвижиле протеините, во системот се додаваат специфични обоени супстанции како на пример bromophenol blue. Оваа боја е мала молекула што мигрира пред патот на протеините. Откако електрофорезата ќе биде комплетирана, тогаш протеините се прават да станат видливи со третирање на гелот со протеинска боја како на пример Coomassie Brilliant Blue. Релативната мобилност на протеините потоа се пресметува според следната формула:

$$R_{\text{ж}} = \frac{\text{distance protein moves}}{\text{distance dye moves}}$$

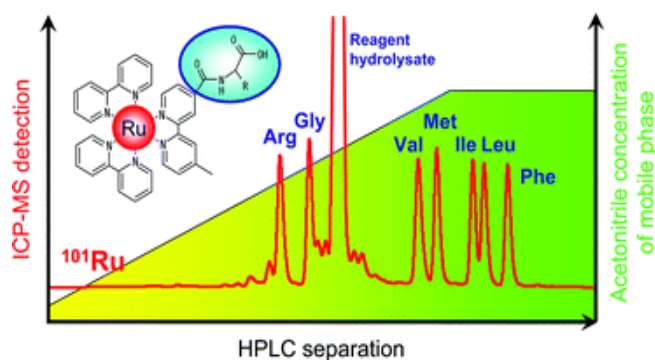
Овој тип на електрофореза често се употребува за определување на составот на протеините во храната.

Електрофореза базирана на изоелектричната точка на протеините

Оваа техника е всушност модифицирана електрофореза каде што протеините се раздвојуваат врз база на нивниот полнеж. Притоа, стационарната фаза кај оваа техника е гел каде постои градиент во рН вредностите (на пример, како одиме од почетокот кон крајот на стационарната фаза, рН на гелот се менува да речеме постепено од 9, 8, 7...3, 2, 1). Кај оваа техника, кога во системот се пропуштат протеини, тие ќе мигрираат под дејство на електричното поле до местото каде што рН вредноста на гелот ќе биде еднаква на вредноста на изоелектричната точка на дадениот протеин. На тоа место, дадениот протеин ќе престане да се движи бидејќи при таа рН вредност протеинот не носи полнеж, па според тоа не може да се движи под дејство на електричното поле. За да биде успешна оваа техника, потребно е да имаме соодветен гел кој ќе има широк градиент на рН. Денес постојат комерцијално достапни гелови што покриваат рН во ранг од 3-10 единици.

6.3.5. Анализа на аминокиселини

Анализата на аминокиселини се употребува за да се определи составот на аминокиселините во структурата на протеините. Кај овие анализи, протеините најпрво се хидролизираат со употреба на силна киселина, со цел од составот на протеинот полимер да се ослободат аминокиселините. Потоа, ослободените аминокиселини се определуваат со употреба на јоно изменувачка хроматографија или апсорпциона хроматографија.



Анализа на аминокиселини со хроматографија

7. *Анализа на јаглехидрати*

7.1 Вовед

Јаглехидратите се едни од најбитните компоненти во голем број на хранливи производи. Тие во храната може да бидат присутни како изолирани молекули, или пак во форма на соединенија каде се поврзани со други молекули. Индивидуалните јаглехидрати може да се поделат врз база на бројот на мономерни во нивниот состав. Така, имаме поделба на моносахариди, олигосахариди и полисахариди. Молекулите каде што јаглехидратите се поврзани во соединенија со некои протеини се нарекуваат гликопротеини, додека кога јаглехидратите се поврзани со липиди, таквите молекули се наречени гликолипиди. Некои од јаглехидратите се сварливи во нашиот организам и таквите јаглехидрати се битни енергетски состојки во нашата исхрана. Постојат меѓутоа и јаглехидрати што не можат да се разложат во нашите организми и тие не ослободуваат енергија. Овие несварливи јаглехидрати се дел од групата на супстанции познати под името *хранливи влакна*, каде спаѓа лигнинот на пример. Конзумирањето на значителни количини од овие диетални влакна е доста корисно, бидејќи е познато дека тие го намалуваат ризикот од појава на канцерогени заболувања, коронарни болести на срцето, дијабетис и сл. Покрај ова, јаглехидратите се употребуваат и како засладувачи во храната, а играат битна улога и во аромата и составот на голем број хранливи производи. Поради тоа, често е потребно да се знае вкупната количина на јаглехидрати во храната, како и нивниот состав. Познавањето на составот и содржината на јаглехидрати е битно и поради законските регулативи, квалитетот на храната, поради знаењето на нутриционистичката вредност на производите, а битно е и за дизајнирањето на процесите на обработка на храната.

7.2. Поделба на јаглехидратите

Моносахариди

Моносахаридите се наједноставни јаглехидрати што се лесно растворливи во вода, а при нормални надворешни услови се во форма на кристали. По хемиски состав, моносахаридите се полихидроксилни алдехиди или кетони што содржат една карбонилна група и една или повеќе хидроксилни групи во својот состав. Најголем број на природните моносахариди се составени од пет (пентози) или шест (хексози) јаглеродни атоми. Најпознати од групата на моносахариди се хексозите, а од нив типични претставници се гликозата, фруктозата и галактозата, додека од пентозите најпознати се арабинозата и ксилозата. Реактивните центри во составот на моносахаридите се карбонилната (алдехидната или кето групата) и хидроксилните групи.

Олигосахариди

Тоа се мали полимери изградени од моносахаридни единици што гликозидно се поврзани помеѓу себе. Така, дисахаридите се олигосахариди што се изградени од две мономерни единици на моносахариди, а трисахаридите од три мономери на моносахариди и т.н. Олигосахаридите што се изградени од гликоза фруктоза и галактоза најчесто се застапени во храната. Најпознат дисахарид е сахарозата (обичниот шеќер што го користиме во исхраната).

Полисахариди

Најголем број на јаглехидратите што се среќаваат во природата се полисахариди што се полимери изградени од повеќе од 20 мономерни единици на моносахариди. Полисахаридите што се изградени само од едентип на мономерни единици се наречени хомополисахариди (*скробот*, целулозата и гликогенот на пример, се изградени само од гликозани молекули), додека полисахаридите што се изградени од различни мономерни единици се наречени хетерополисахариди (такви се пектин и хемицелулоза на пример).

7.3. Методи за анализа

Развиени се голем број на техники за определување на вкупната концентрација на јаглехидрати во храна од различна природа. Најголем број од овие техники можат да се најдат во книгите *Food Analysis* by Nielssen или *Food Analysis* by Pomeranz and Meloan.

7.4. Моносахариди и олигосахариди

7.4.1. Подготовка на примерокот за анализа

Степенот на подготовка на примерокот за анализа на јаглехидратите зависи пред се од типот на храната што се анализира. Така на пример, за определувањето на јаглехидрати во овошја, сокови, мед и сл. не се потребни комплицирани постапки за подготовка на примерокот. Од друга страна, за определување на јаглехидратите во хранливите производи каде што јаглехидратите се врзани во соединенија (како јатковидните плодови-лешници, бадеми), житариците, лебот и зеленчукот, потребни се значителни мерки за подготовка на примерокот за анализа. Кај овие хранливи производи најпрво е потребно да се сепарираат јаглехидратите од другите состојки во храната пред тие да бидат анализирани. Методите за излоација на јаглехидратите зависат пред се од типот на јаглехидратите, како и од составот на матриксот на храната и од целите на анализата. Една од најчестите методи што се употребуваа за екстракција на јаглехидратите со ниска моларна маса е вриењето на примерокот од храна во раствор што содржи 80% алкохол. Притоа, моносахаридите и олигосахаридите се растворливи во алкохол, додека полисахаридите, диеталните влакна и протеините не се растворливи во алкохолот. Потоа, растворливите компоненти од храната можат да се одвојат од нерастворливите со филтрирање, каде од филтратот (растворот што поминува низ филтерот) потоа ги анализираме јаглехидратите со ниска моларна маса. Проблем кај оваа техника на изолација е што во филтратот, заедно со моносахариди и олигосахариди, може да бидат присутни и други компоненти од храната како аминокиселини, витамини, минерали, органски киселини и сл. Најчесто е потребно да се изврши отстранување на овие

компоненти пред да се започне со анализа на јаглехидратите. Тоа најчесто се врши со пропуштање на растворот (филтратот) низ колона наполнета со јоно изменувачки смоли. Бидејќи најголем број на јаглехидратите се поларни молекули што немаат полнеж, тие можат да се одделат од молекулите што носат полнеж со поминување на смесата низ некој материјал што има јоно изменувачки способности (т.н. јоноизменувачки смоли). На тој начин, компонентите што се набиени (имаат полнеж) ќе се врзат на јоно-изменувачката смола, додека шеќерите нема да се задржат и ќе поминат низ колоната и така ќе се одвојат од другите органски компоненти. Пред да се почне со анализа на јаглехидратите што сме ги сепарирале, алкохолот треба да се отстрани, а тоа се прави најчесто со испарување под вакуум.

7.4.2. Хроматографски и електрофоретички методи за анализа на јаглехидратите

Како што претходно објаснивме, најголем број на органските материи во храната можат да се определат со помош на хроматографски техники. Содржината на јаглехидратите во храната може да се определи со разни хроматографски техники како што се тенкослојната хроматографија, гасна хроматографија или високо-притисочна течна хроматографија. Кај сите овие техники можно е да се направи сепарација на јаглехидратите врз база на нивната различна апсорпција на стационарната фаза од хроматографските колони. За определување на структурата на јаглехидратите, обично хроматографските техники се користа во спрега со нуклеарно магнетно резонантните техники.

Јаглехидратите можат да се определат и со помош на електрофореза, но само откако ќе бидат претходно дериватизирани за да можат да се претворат во продукти што ќе имаат полнеж во својот состав. Тоа најчесто се прави со нивна реакција со борна киселина. Потоа, раздвојувањето на јаглехидратите ќе се изврши врз база на нивната големина: колку е помал јаглехидратот, толку тој побрзо ќе се движи во електричното поле и обратно.

7.4.3. Хемиски методи

Големиот број на хемиски методи што се развиени за определување на содржината на моносахариди и олигосахариди се базираат на фактот што овие јаглехидрати се *редукциски средства* што можат да реагираат со други компоненти и притоа да даваат талози или пак да се претвораат во продукти што се обоени што потоа можат да бидат определени. Концентрацијата на јаглехидратите потоа може да се определи спектрофотометриски, гравиметриски или со помош на гравиметриски (таложни) методи.

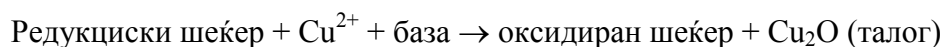
Титрациски методи

Методата според Lane-Eynon е пример за титрациона метода за определување на содржината на редуциските шеќери во примерок на храна земен за анализа. При оваа метода, со помош на бирета се става растворот на шеќерите во раствор на бакар сулфат што врие и што содржи индикатор „methylene blue,. При тоа, редуциските шеќери ќе реагираат со бакарот, а откако целата содржина на бакарот ќе изреагира, тогаш наредната количина од додадени шеќери ќе реагираат со индикаторот и притоа растворот што претходно имал сина боја ќе се обезбои. За оваа метода потребно е претходно да се подготви калибрациона крива со употреба на стандардни раствори.

Недостатоците на оваа метода се во (i) малата прецизност и стриктноста на условите (ii) во неможноста да бидат разликувани видовите на шеќер (iii) не може директно да се определи содржината на шеќер (iv) методата е осетлива на интерференци од други молекули што имаат редуцирачки својства.

Гравиметриски методи

Методата според Munson и Walker е пример за гравиметриско определување на содржината на редуцирачките шеќери. Кај оваа метода, јаглехидратите се оксидираат во присуство на топлина и во присуство на вишок на бакар сулфат и натриум тартарат при внимателно одбрани услови, што придонесува до појава на талог од бакар (I) оксид Cu_2O :



Притоа, масата на талогот е директно пропорционална со масата на редукциските шеќери и со примена на стехиометриска пропорција може да се определи содржината на редукциски шеќери во храната, мерејќи ја притоа масата на издвоениот талог од Cu_2O . И овој метод ги има истите недостатоци како и претходната метода Lane-Eynon, меѓутоа методата е порепродуцибилна и поточна од претходната.

Колориметриски методи

Таканаречениот „Anthrone метод,, е пример за колориметриска постапка за определување на вкупната содржина на шеќерите во храната. Кај оваа метода, шеќерите реагираат со супстанцата anthrone во кисела средина при што се добива комплекс со плаво-зелена боја. Примеркот се меша со сулфурна киселина и со реагенсиот anthrone reagent и се подложува на вриење се додека реакцијата не се комплетира целосно. Потоа растворот се лади, а потоа се отчитува апсорбанцата на тој раствор на бранова должина од 620 nm. Со овој метод се определуваат и редуцирачките и нередуцирачките шеќери присутни во храната. И за овој метод потребна е подготовка на калибрациона крива со помош на стандардни раствори.

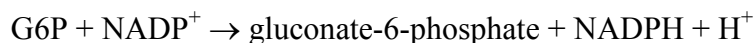
7.4.4. Методи базирани на ензимски реакции

Аналитичките методи базирани на ензиматски реакции се темелат на фактот што даден ензим може да катализира само дадена специфична реакција. Овие методи се брзи, многу селективни и специфични и можат да се употребат за определување на ниска концентрација на шеќери. Хранливите производи во течна состојба можат со овие методи директно да се анализираат, додека кај храната во цврста состојба потребно е прво да се преведе во хомоген раствор. Кај овие методи постојат две техники: (i) се остава ензимската реакција да оди до крај, а потоа се мери концентрацијата на продуктот што е пропорционална на концентрацијата на шеќерот присутен во храната, или (ii) се мери брзината на ензимската реакција бидејќи брзината на овие реакции се пропорционални со

концентрацијата на супстратот (т.е. шеќерите). Некои примери за овие методи се дадени подолу:

D-Glucose/D-Fructose

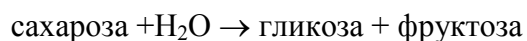
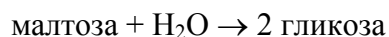
Овој метод е погоден за определување на концентрацијата на гликоза и фруктоза во примерок од храна земен за анализа. Најпрво гликозата се претвора во glucose-6-phosphate (G6P) со помош на ензимот hexokinase и ATP. Потоа, G6P се оксидира со помош на NADP^+ во присуство на ензим G6P-dehydrogenase (G6P-DH)



Содржината на образуваниот NADPH е пропорционална со содржината на G6P во примерокот и со мерење на апсорбанцата на 340nm може да се определи концентрацијата на гликоза. Содржината на фруктоза се определува со претходно претворање на фруктозата во гликоза со употреба на специфичен ензим, и со повторување на гореописаната постапка.

Малтоза/Сахароза

Концентрациите на малтоза и сахароза (овие шеќери се дисахариди) можат да се определат откако претходно ќе бидат определени концентрациите на гликозата и фруктозата во примерокот. Најпрво малтозата и сахарозата ќе бидат разградени до нивните моносахаридни мономерии со помош на ензимот α -glucosidase:



Потоа, концентрацијата на гликоза и фруктоза може да се определи со претходно опишаниот метод. Најголем проблем кај оваа метода е тоа што голем број на

олигосахариди може да се претворат во моносахариди со примена на ензимот α -glucosidase, па тешко е да се определи кои олигосахариди се присутни во примерокот.

7.4.5. Физички методи за определување на содржината на јаглехидрати во храната

Постојат повеќе методи што се базирани на физичките особини на јаглехидратите. Овие методи се темелат на промените во некои физички особини на храната кога во нив доаѓа до промена на концентрацијата на јаглехидрати. Најчесто употребувани техники за овие определувања се полариметријата, рефрактометријата, инфра црвената спектроскопија и методите базирани на мерење на густината.

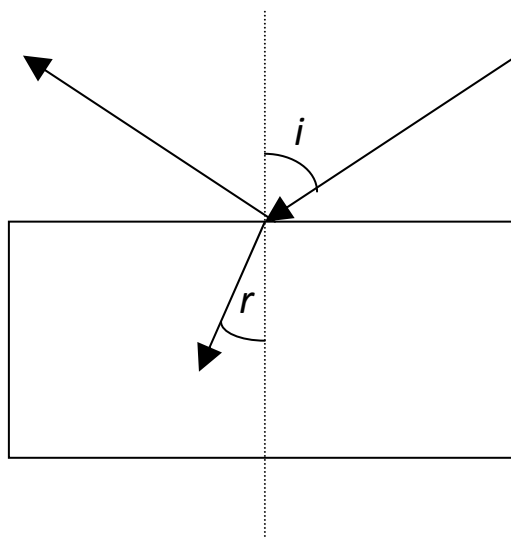
Полариметрија

Молекулите што во својот состав содржат асиметричен (хирален С-атом), а такви се јаглехидратите, имаат способност да ја вртат рамнината на поларизираната светлина. Овој феномен е искористен за определување на содржината на јаглехидратите со помош на полариметар. Полариметарот е инструмент што може да го мери аголот за кој е ротирана на поларизираната светлина кога поминува низ раствор што содржи хирални С-атоми. На тој начин, колку концентрацијата на шеќери е поголема, толку ќе биде поголемо отклонувањето на аголот на поларизираната светлина што поминува низ раствор што содржи јаглехидрати. Недостаток кај оваа метода е присуството на супстанции што содржат хирални С-атоми, а што не се шеќери (такви се аминокиселините, на пример). За оваа метода потребно е да се конструира калибрациона крива со употреба на стандардни раствори.

Методи базирани врз мерење на индексот на рефракција

Индексот на рефракција (n) на дадеен материјал е однос од брзината на светлината во вакуум и брзината на светлината што поминува низ даден материјал ($n = c/c_m$). Овој параметар може да се определи со мерење на аголот на рефракција (r) и влезниот агол (i) на светлината на границата помеѓу материјалот што се испитува и друг

материјал чиј индекс на рефракција е познат (за тоа се применува законот на Snell: $\sin(i)/\sin(r) = n_2/n_1$). Во пракса, индексот на рефракција на јаглехидратите се мери на границата во однос на кварцот. Како се зголемува концентрацијата на јаглехидрати во примерокот за анализа, така се зголемува и индексот на рефракција, и тој факт може да се употреби за мерење на содржината на јаглехидрати во примерокот. Треба да се напомене дека индексот на рефракција е зависен од температурата и брановата должина, па мерењата обично се вршат на специфична температура (20 °C) и при дадена бранова должина (589.3nm). Овој метод е брз и едноставен и рутински се применува во индустријата за храна за определување на концентрацијата на шеќери во сирупи, мед, мармалади и сл.



Принцип на мерење на индексот на рефракција

Густина

Густината на даден материјал се дефинира како однос од масата и волуменот на тој материјал. Со зголемување на концентрацијата на јаглехидрати доаѓа до зголемување на густината на водениот раствор во кој јаглехидратите се растворени. На тој начин може да се определи концентрацијата на јаглехидрати во храната со мерење на густината во

специјално иработени шипиња или со примена на дензиметри. И ова атехника рутински се употребува во индустријата за храна за определување на содржината на сокови во разни пијалоци.

Инфрацрвена спектроскопија

Јаглехидратите содржат функционални групи во својот состав што можат да апсорбираат енергија во специфично инфрацрвеното подрачје од електромагнетниот спектар на зрачење каде не апсорбираат останатите молекули присутни во храната. Тоа овозможува определување на содржината на јаглехидрати во разни примероци од храна. Овие методи се брзи и недеструктивни, но многу се скапи. За да се определи составот (природа) на јаглехидратите присутни во храната обично инфрацрвената спектроскопија се користи во спрега со нуклеарната магнетна резонанца NMR или со масената спектрометрија.

7.4.6. Определување на јаглехидрати со примена на Имуноасени

Имуноасените се биохемиски тестови со чија помош се определува концентрацијата на дадени супстанции во некој комплексен примерок. Денес се познати голем број на комерцијално достапни имуноасени за определување на содржината на јаглехидрати со мала моларна маса во комплексни примероци. Овие методи завземаат се поголемо место поради нивната брзина при анализите и прецизноста, а и поради малата цена на чинење. Со текот на времето кај животните се формираат т.н. антитела за специфични молекули на јаглехидрати. Овие антитела можат по одредено време да се екстрахираат од телата на животните и да се употребуваат како тестери за определување на концентрацијата на специфични јаглехидрати. Имуноасените се доста осетливи, специфични и лесни за употреба.

7.5 Анализа на полисахариди и диетални влакна

Во храната се присутни голем број на различни полисахариди. Полисахаридите можат да се класифицираат врз база на нивните молекуларни карактеристики, врз база на нивните физичко-хемиски карактеристики (растворливоста во вода, вискозитетот и сл.) и врз база на нивната нутриционална функција (сварливи или несварливи во организмите). Најголем број од полисахаридите содржат од 100 до неколку илјади моносахаридни единки во својот состав. Некои полисахариди се разгранети, додека други се линеарни молекули. Голем број од полисахаридите се сварливи во човечкиот организам и тие се важен извор на енергија при метаболитичките процеси (таков е скробот на пример). Меѓутоа, постојат и полисахариди што не се сварливи во нашиот организам (пример целулозата, хемицелулозата и пектините) и овие полисахариди формираат група од т.н. *диетални (или хранливи) влакна*. Во оваа група спаѓа и полисахаридот lignin (кој што е полимер изграден од ароматични молекули). Конзумирањето на овие диетални хранливи полисахариди е од големо значење за човекот бидејќи е покажано дека тие придонесуваат за спречување на голем број срцеви и канцерогени заболувања, како и спречување на појавата шеќерна болест-дијабетис.

7.5.1. Анализа на скроб

Скробот е најпознат полисахарид што е сварлив во нашите организми и често е застапен во храната. Тој е еден од главните извори на енергија во нашите тела. Природниот скроб се е изграден од гранули од 3 - 60 μm што се растворливи во вода, но при процесите на преработка на храната скробот најчесто не се наоѓа во таа природна форма. Скробот е изграден од од два типа на гликозни хоополисахариди: *amylose* (изградена од 500-2000 гликозни единки) што е линеарен полимер, и *amylopectin* (изграден од >1,000,000 гликозни единки) што е еден тип на интензивно разгранет гликозен полимер. Овие два типа на скроб имаат различни физичко-хемиски својства, па многу често е потребно да се определи содржината на поединечните полимери од кои е изграден скробот, а битно е да се определи и вкупната концентрација на скроб во примерокот.

Подготовка на примерокот за анализа. Содржината на скроб во храната не може директно да се определи, бидејќи скробот се содржи во доста комплексен матрикс во храната. Многу често скробот е присутен во форма на гранули, а во таа форма тој не може да реагира со хемикалиите што се употребуваат за негово определување. Поради тоа, неопходно е скробот да биде издвоен од другите компоненти присутни во храната пред да се започне со негова анализа.

Во природната храна како зеленчукот, житариците и сл. гранулите од скроб се раздвојуваат од другите компоненти со сушење, преципитација во вода, флтрирање или со центрифугирање. Гранулите од скроб се нерастворливи во вода и имаат релативно голема густина (1500 g/Литар), па на тој начин тие ќе се исталожат на дното од садот при процесот на центрифугација, и притоа ќе се одвојат од компонентите што имаат помала густина и што се полесно растворливи во вода. Примероците од храна најчесто се сушат, се сецкаат и се раствораат во врел 80% раствор на етанол. Моносахаридите и дисахаридите се растворливи во алкохол, додека скробот не е растворлив. На тој начин скробот може да се раздвои од другите шеќери со филтрација или со центрифугирање на растворот.

Методи за анализа. Откако скробот ќе биде изолиран, за определување на неговата содржина постојат голем број на методи:

- Специфични ензими се додаваат кон растворот на скроб, при што скробот се разложува до гликоза, а гликозата потоа се мери со некоја од претходно опишаните методи или со хроматографија.
- Јодот може да реагира со скробот, па често за определување на содржината на скроб, во растворот на скроб се додава јод, при што се формира комплекс помеѓу јодот и скробот. Овој талог потоа може да се анализира со гравиметриска метода за анализа.

- Доколку во растворот на скроб не постојат супстанции што би можеле да интерферираат, скробот може да се определи полариметриски или со мерење на индексот на рефракција.

Амилазата и амилопектинот може да се определат со истите методи како и тие за определување на скробот. Тоа може да се изведи со додавање на специфични хемикалии што можат да формираат нерастворлив комплекс со амилазата на пример, но не и со амилопектинот. Така на пример, некои алкохоли имаат својство да градат талог со амилазата, а не и со амилопектинот.

7.5.2. *Анализа на хранливи влакна*

Како што претходно нагласивме, хранливите влакна се многу битни во исхраната и во последните 20тина години развиени се голем број на методи за определување на овие полимерни јаглехидрати. Главни состојки на хранливите влакна се целулозата, хемицелулозата, пектинот и лигнинот, и сите овие се несварливи во човечкиот организам. Во основата на методите за определување на хранливите влакна се постапки што треба да се слични на процесите што се случуваат во нашиот систем за дигестија.

7.5.2.1. Постапки при подготовката на примерок и при анализата

Постојат голем број на постапки што се употребуваат кај методите за анализа на хранливите влакна, а најбитните се:

- *Отстранувањето на липидите.* Липидите се отстрануваат со помош на екстракција со органски растворувачи.
- *Отстранување на протените.* Протеините најчесто се разложуваат со употреба на ензими, силни бази или силни киселини, и притоа се добиваат аминокиселини. Добиените аминокиселини од разложувањето на протеините се отстрануваат од растворот во кој се присутни и хранливите влакна најчесто со филтрација или со таложување.

- *Отстранување на скробот.* Скробот може да се желатизира со примена на топлина (со загревање) во присуство на вода, а потоа се разложува со помош на ензими или со силни киселини или бази. Притоа, како продукт се добива гликоза што од нерастворливите хранливи влакна на полисахаридите целулоза или лигнин лесно се отстранува.
- *Селективно таложеење на хранливите влакна.* Хранливите влакна може да се одвојат од другите компоненти присутни во храната со нивно селективно таложеење, а тоа се врши најчесто во 80% раствори на етанол во кој ќе се растворот моносахаридите, аминокиселините и олигосахаридите, но нема да се растворот хранливите полисахаридни влакна и тие ќе се одвојат со филтрација од другите компоненти.
- *Анализа на хранливите влакна.* Содржината на хранливите полисахаридни влакна во храната може да се определи *гравиметриски* (со мерење на масата на талогот после разводјувањето во алкохолна средина од другите компоненти од храната), или хемиски-со нивно разложување со хемиски средства до моносахаридни единици, и потоа се определуваат со претходно опишаните методи.

7.5.2.3. Гравиметриски методи

Метода за грубо определување на хранливи полисахаридни влакна

Оваа метода може да се примени за определување на содржината на несварливите полисахаридни влакна во храната. Тоа се прави со секвенционална екстракција на обесмастен примерок од храна со тетирање со 1.25% H_2SO_4 или 1.25% NaOH. Потоа нерастворениот остаток се одвојува со филтрирање, се суши се мери и потоа се минерализира со цел да се определи масата на минералните материји евентуално присутни во резудите од хранливите влакна. Со оваа постапка може да се определат содржините на целулоза и лигнин, но не и содржините на хемицелулоза и пектините бидејќи тие се раствораат во киселината или базата, а тоа значи не се исталожуваат за да можат нивната содржина да биде определена од масата на талогот. Со цел да се определи вкупната

содржина на хранливи влакна од полисахариди, се употребува метода со примена на 95% алкохол, во кој се исталожуваат сите хранливи полисахаридни влакна. Талогот потоа се мери се суши и се пресметува вкупната количина на хранливи влакна во примерокот храна.

7.5.2.4. Хемиски методи

Кај хемиските методи, содржината на хранливи полисахаридни влакна е еднаква на збирот од содржините на сите полисахариди што не спаѓаат во групата на скробот плус лигнините што преостануваат откако сите сварливи јаглехидрати ќе бидат отстранети. Моносахаридите се определуваат со претходно опишаните методи.

Метода според Englyst-Cummings

Кај оваа метода, примерокот од храна што претходно е обезмастен се загрева во вода при што доаѓа до желатинизација на скробот. Потоа се додаваат ензими со цел да ги разложат скробот и протеините. Во растворот потоа се додава чист етанол што ќе предизвика исталожување на хранливите полисахаридни кои потоа се одвојуваат од растворените компоненти со центрифугирање. Талогот потоа се третира со силни концентрирани минерални киселини, при што полисахаридните влакна се разложуваат до моносахариди, а концентрацијата на моносахаридите потоа се определува со методите што веќе си обработивме. Оваа метода се применува за определување на содржината на сите хранливи полисахаридни влакна, но не и за содржината на лигнинот. Ова е така поради фактот што лигнинот не е полисахарид, па тој не може да се разложи на полисахариди при процесот на дигестија. Кај голем број на хранливи производи тоа не е проблем, бидејќи концентрацијата на лигнин е многу мала. Доколку храната содржи поголеми количини на лигнин, тогаш може да се употреби некоја комерцијална метода за негово определување.

ХРОМАТОГРАФИЈА

принципи на работа, хроматографски техники и примена

Бидејќи хроматографските методи се едни од најзастапените аналитички техники при испитувањето на квалитетот на храната, во следните поглавја ќе се запознаеме со принципите на овие техники, со поделбата на хроматографските методи, како и со нивната примената.

1. ХРОМАТОГРАФИЈА

Хроматографијата претставува физички метод на разделување помеѓу две фази на некоја смеса што се состои од две **(2)** или повеќе компоненти. Вообичаено е едната фаза да е неподвижна, со релативно голема површина, а другата фаза да е подвижна. Неподвижната фаза може да биде течна или цврста, додека подвижната може да биде течна или гасовита.

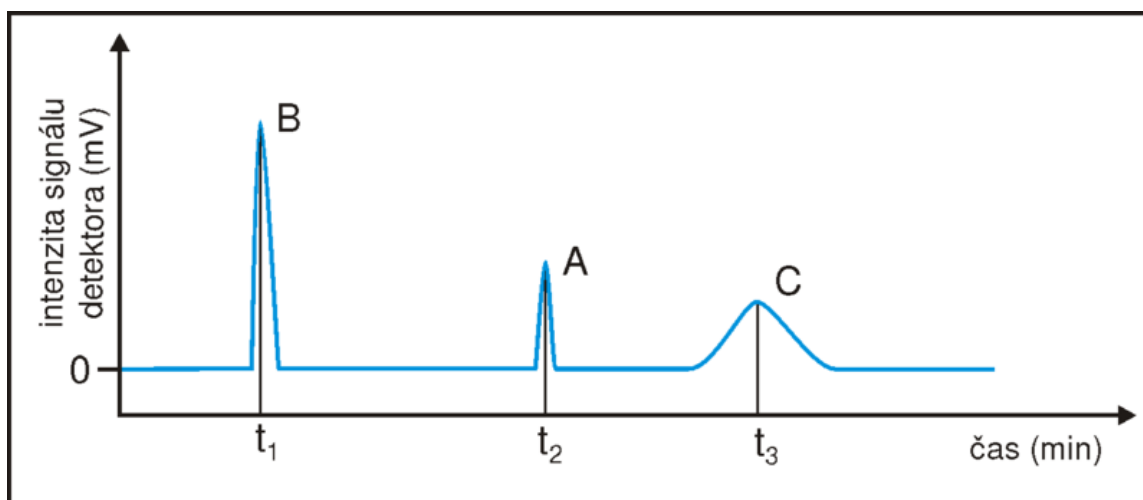
Под хроматографија, во најопшт случај, се подразбираат група методи чија основна цел е раздвојување **(разделување)** на некоја смеса на нејзините компоненти и определување на количеството на секоја од разделените компоненти. Хроматографијата припаѓа на групата методи што имаат важно место во органската хемија, биохемијата, фармакологијата и технологијата (при контрола на на полупроизводите во одделни фази на производството, како и при контролата на финалните производи).

Зборот хроматографија потекнува од два грчки збора **hromos** што значи боја, и **graphein**, што значи пишува. Почетните искуства на ова поле се однесувале на разделувањето пигменти со различни обојувања, од каде што потекнува првиот дел од називот. Меѓутоа, овој збор денеска го нема истото значење бидејќи процентот на обоените супстанции што може да се испитуваат со овој метод е незначителен во однос на необоените.

Во литературата можат да се сретнат најразлични шеми за класификација и поделба на хроматографските методи. Најчеста класификација е според начинот на кој се врши разделувањето на компонентите и според феноменот на преносот на масата.

Според начинот на разделување, хроматографијата се дели на планарна хроматографија и хроматографија во колони. Во планарната хроматографија спаѓаат: хроматографијата на хартија и тенкослојната хроматографија. Во хроматографијата во колони спаѓаат: гасната, течната, јон-изменувачката и гелната хроматографија.

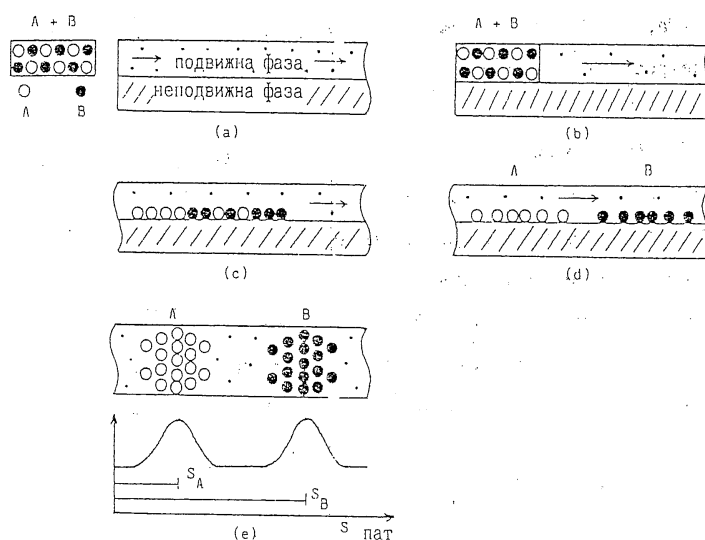
Според феноменот на пренос на маса, хроматографијата се дели на: апсорпциона, распределбена, јонско-изменувачка и гелна хроматографија. За да може подобро да се разбере принципот на кој работи овој метод најпрво ќе ги разгледаме основните законитости и феномени по кои се одвива преносот на маса, а потоа и посебно ќе ги проучиме одделните хроматографски методи.



Приказ на еден хроматограм

Апсорпциона хроматографија. Кај апсорпционата хроматографија двете фази се: гас – цврсто или течна – цврсто. Разделувањето на компонентите од испитуваната смеса се врши врз база на нивните различни апсорпциони својства, односно нивната селективна апсорпција врз даден апсорбенс. Ова разделување на компонентите се врши помеѓу

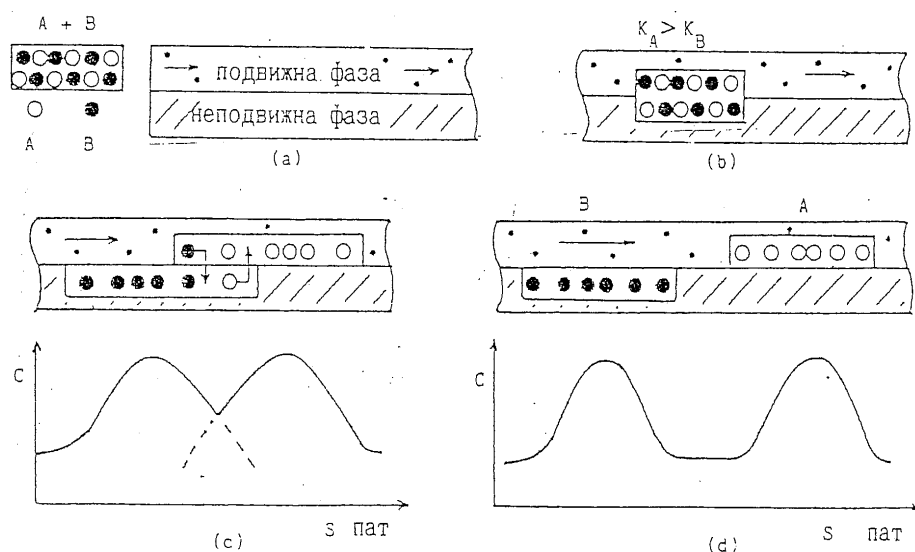
подвижната и површината на неподвижната фаза (**апсорбенсот**). Помеѓу подвижната и неподвижната фаза постои апсорпционо – десорпциона реверзибилна рамнотежа, што пак значи дека еднаш апсорпираната компонента може повторно да се врати во подвижната фаза, односно да се десорбира со дотек на свеж подвижен флуид. Десорпцијата во хроматографијата всушност претставува плакнење на колоната. За време на плакнењето, во апсорбирана состојба подолго време ќе се задржи онаа компонента која е појакко апсорбирана (која има поголем афинитет спрема апсорбенсот), бидејќи потешко ќе се десорбира. Спротивно, компонентата која послабо е апсорбирана полесно ќе се десорбира и побрзо ќе се движи со подвижната фаза. Поради овој феномен на селективна апсорпција и различна брзина на движењето на компонентите се врши разделување и формирање на хроматографски зони или создавање хроматограм.



На сликата е прикажан процес на создавање на еден хроматограм при раздвојување на смеса која се состои од две компоненти: **компонента А** (бели кругчиња) и **компонента В** (црни кругчиња). Компонентата **А** има поголем афинитет спрема апсорбенсот, појакко е апсорбирана и поради поголемото дејство на апсорпционите сили за исто време таа изминува пократок пат од компонентата **В**. Концентрациите на компонентите **А** и **В** можат да се мерат со различни физичко – хемиски методи:

спектроскопија; радиохемиска анализа; масена спектрометрија; потенциометриски титрации и др.

Распределбена хроматографија. Кај распределбената хроматографија двете фази се течност – течност или гас – течност. Разделувањето на компонентите од испитуваната смеса се врши врз база на нивниот различен коефициент на распределба во однос на подвижната и неподвижната фаза.



Шематски приказ на создавање хроматографски зони кај распределбена хроматографија: а) хроматографска колона пред внесувањето на пробата; б) веднаш по внесувањето на пробата; в) снимање на хроматограм во одделни фази на разделување; г) снимање на хроматограм во одделни фази на разделување

На сликата е прикажан процес на создавање на хроматографски зони при разделување на смеса која се состои од две компоненти А (бели кручиња) и В (црни кручиња).

Ако во колоната на сликата а се додаде смеса (А+В), таа различно ќе се распредели во двете фази (сл.б.) и ќе се воспостави динамичка рамнотежа. Според **Нернстовиот закон за распределба**, во состојба на рамнотежа, коефициентот на распределба на некоја

супстанција во две фази кои не се мешаат меѓу себе се дефинира како однос на нејзината концентрација во двете фази:

$$K = \frac{C_P}{C_S}$$

K – коефициент на распределба

C_P – концентрација на испитуваната супстанца во подвижната фаза;

C_S – концентрација на испитуваната супстанца во стационарната фаза

Ако треба да се раздели смеса од две компоненти, тогаш според **Нернстовиот закон**:

$$K_A = \frac{C_{AP}}{C_{AS}} \qquad K_B = \frac{C_{BP}}{C_{BS}}$$

Ако $K_A > K_B$, тогаш постои разлика во коефициентот на распределба што условува разлика во брзината на движењето на компонентите **A** и **B** низ колоната поради што тие ќе се разделат, а нивното разделување создава хроматографски зони (сл С.). Според тоа, вредностите на K_A и K_B ја определуваат брзината со која ќе се движат компонентите **A** и **B**, додека големината на количникот K_A/K_B (што се нарекува фактор на разделување) ја одредува ефикасноста на разделувањето.

Треба да се нагласи дека коефициентот на распределба нема константна вредност и тој е функција од концентрацијата. Меѓутоа за идеални раствори, каде нема промена на внатрешната енергија за време на мешањето и не постојат сили на привлекување и одбивање помеѓу компонентите, коефициентот на распределба има константна вредност. Реалните раствори се однесуваат идеално при бескрајно разредување. Во спротивно, кај реалните раствори, наместо концентрацијата, се земаат активитетите.

Јонско-изменувачка хроматографија. Кај јонско-изменувачката хроматографија подвижната фаза е течност, а неподвижната фаза е цврста супстанција. Со оваа хроматографија се разделуваат јонски видови (катјони и анјони) врз база на различни потенцијали на јонска измена. За да го објаснеме механизмот на јонската измена ќе се послужиме со наједноставен случај, а тоа е кога неподвижната фаза има кристална структура. Како што е познато, во кристалната решетка секој јон е опкружен со спротивно наелектризирани јони. Помеѓу два спротивно наелектризирани јона дејствуваат Кулонови привлечни сили, чија големина зависи од растојанието помеѓу јоните и нивниот релативен полнеж. Според тоа, јоните што се наоѓаат на површината на кристалот се послабо врзани од оние во внатрешноста. Кога кристалот се наоѓа во јак поларен растворувач (на пр. вода), површинските јони што се слабо врзани може да се заменат со други јони од растворот, а притоа да не се уништи кристалната решетка. Јонската измена, всушност претставува измена на јони со ист предзнак помеѓу нерастворливата цврста фаза и растворениот електролит што се во непосреден контакт. Ефектот на јонската измена ќе зависи од природата и јачината на силите со кои е врзан јонот во кристалот, големината на двата јона што се разменуваат, концентрацијата на изменувачките јони во електролитот, поларноста на растворувачот и др.



Уред за јоноизменувачка хроматографија

Гелна хроматографија. Кај гелната хроматографија цврстата фаза претставува мрежа од гелови со широк опсег на големина на порите. Како растворувач обично се користи вода или пуферски водени раствори. Овој метод се користи за раздвојување на молекули со голема молекуларна маса, односно за фракционирање на полимери. Разделувањето се врши на тој начин што течната фаза (која содржи молекули со различна големина) поминува низ порозниот гел материјал кој може да има пори со различен дијаметар. Помалите молекули влегуваат во порите, додека пак поголемите продолжуваат да се движат со подвижната фаза.

2. ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОДИ

Во овие методи ќе бидат опишани основните принципи и начинот на работа со одделни хроматографски методи. Планарната хроматографија, хроматографијата на хартија и тенко–слојната хроматографија ќе ги опишеме повеќе информативно (од причина затоа што тие се доста едноставни методи за разделување на одделни компоненти и за нив не се потребни посебни инструментални техники), додека пак хроматографиите во колони (**гасната, течната, јон-изменувачката и гелната**) ќе ги опишеме подетално како модерни инструментални техники.

2.1. Планарна хроматографска анализа

Кај планарната хроматографија испитуваната супстанција се распоредува помеѓу стационарната водена фаза (која е фиксирана на некој порозен инертен носител) и подвижната органска фаза од погодно избран органски растворувач кој не се меша во водата. Испитуваната супстанција се разделува на своите составни компоненти благодарение на нивниот различен коефициент на распределба во водата и органскиот растворувач. Според тоа, планарната хроматографија претставува тип на распределбена хроматографија. Меѓутоа, не е исклучено ни влијанието на носителот на кој е фиксирана

стационарната фаза, така што покрај феноменот на распределба во вкупниот хроматографски процес учествува и феноменот на адсорпција.

Ако носителот на стационарната фаза е лента или лист од хартија, тогаш се работи за хроматографија на хартија. Ако носителот на стационарната фаза е тенок слој од ситнозрнест прашкест материјал нанесен на стаклена плоча, пластична или метална фолија, станува збор за тенкослојна хроматографија.

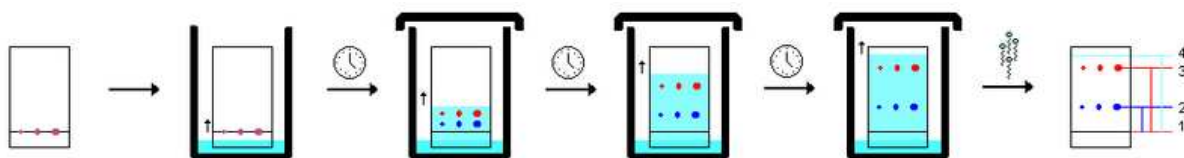
2.2. Хроматографија на хартија

Овој метод најчесто се користи за докажување на мали количества од некоја смеса. Предностите при работата со него се: едноставна изведба, евтина апаратура, голема моќ на раздвојување, брза детекција и мало количество од примерокот што се анализира. Хроматографијата на хартија наоѓа широка примена во биотехнологијата, биохемијата, фармацијата и медицинската хемија. Во почетокот, оваа техника се користела за анализа на аминокиселини добиени со хидролиза на протеини. Со текот на времето, каде што се развивала, се покажувала како успешен метод за разделување и на други групи на соединенија: аминокиселини, алифатични и ароматични амини, нитросоединенија, хетероциклични соединенија што содржат азот, алкохоли, алдехиди, кетони, феноли, карбоксилни киселини, стероиди, шеќери, пептиди, алкалоиди, сулфурни органски соединенија, ензими, витамини, антибиотици и друго.

2.3. Тенкослојна хроматографија

Тенкослојната хроматографија (TLC) – претставува хроматографска метода каде се користи тенок слој (**0.10 – 0.25 mm**) апсорбирачки материјал како што е гел силиконот, алуминиум оксид или целулоза што е нанесен на даден носач направен од стакло, алуминиум или пластика. Смесата се раствора во соодветен растворувач и се нанесува во облик на капки на површината на самата плоча. Плочата потоа се носи во комора на чие дно се наоѓа растворувач, растворувачот ги препокрива нанесените примероци, и поради различната природа на компонентите од смесата тие на различно место биваат

распределени на апсорбирачкиот материјал на самата плоча. Идентификацијата на поединечните компоненти кај оваа техника се врши најчесто со помош на ултравиолетова светлина (UV).



TLC раздвојување

2.4. Методи и техники на хроматографско раздвојување во колони

Според начинот на кој се разделуваат одделни компоненти од некоја проба во колона, постојат три техники на анализа:

а) фронтална анализа; б) анализа со истиснување; в) елуентна анализа

а) Кај фронталната анализа се врши континуирано додавање на испитуваната проба во колоната. Ако пробата се состои од три компоненти **A**, **B** и **C** чии коефициенти за даден систем адсорбенс-раствор се: $K_A < K_B < K_C$, од колоната најпрво ќе излезе чистата компонента **A**, потоа смеса од компонентите **A** и **B** и на крајот растворот кој ги содржи сите 3 компоненти **A**, **B** и **C**. Со овој метод се добива само дел од чистата компонента **A**, која всушност најслабо се адсорбира.

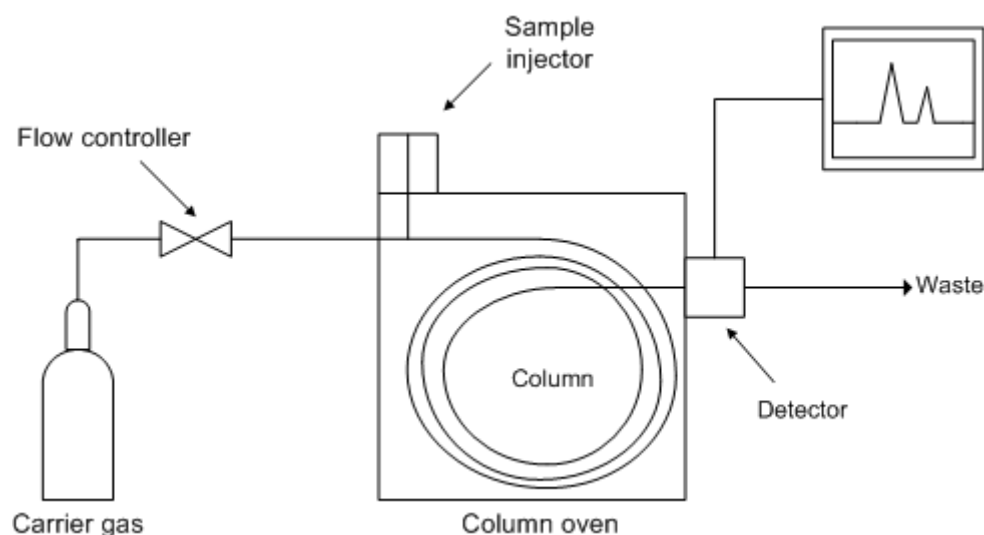
б) Кај анализата со истиснување во почетокот на колоната се воведува мало количество проба што се состои од компонентите **A**, **B** и **C**. Потоа низ колоната се пропушта развивач **D** кој има поголем афинитет кон неподвижната фаза во однос на која и да било од компонентите во пробата; $K_A < K_B < K_C < K_D$. Развивачот **D** ги истиснува сите претходно адсорбирани компоненти. Процесот тече сукцесивно, така што **C** ја истиснува **B**, а **B** компонентата **A**. На овој начин миграционите зони се наоѓаат една покрај друга,

често пати тие се преклопуваат, така што нема целосно раздвојување. Од колоната најпрво излегува компонентата **A**, па **B**, па **C** и, на крајот развивачот **D**.

в) Елуентната анализа е најупотребуван метод во хроматографските колони. Мало количество од проба што се состои од компонентите **A**, **B** и **C** (нека е $K_A < K_B < K_C$) се внесува во едниот крај на колоната, а потоа низ колоната се пропушта подвижната фаза која е инертна во однос на стационарната фаза. Секоја од компонентите по должината на колоната ќе се движи со различна брзина во зависност од нејзиниот афинитет спрема неподвижната фаза. Со овој метод можно е потполно разделување на компонентите **A**, **B** и **C**, а тие од колоната излегуваат по следниов распоред: **A**, па **B**, па **C**.

3. Гасна хроматографија

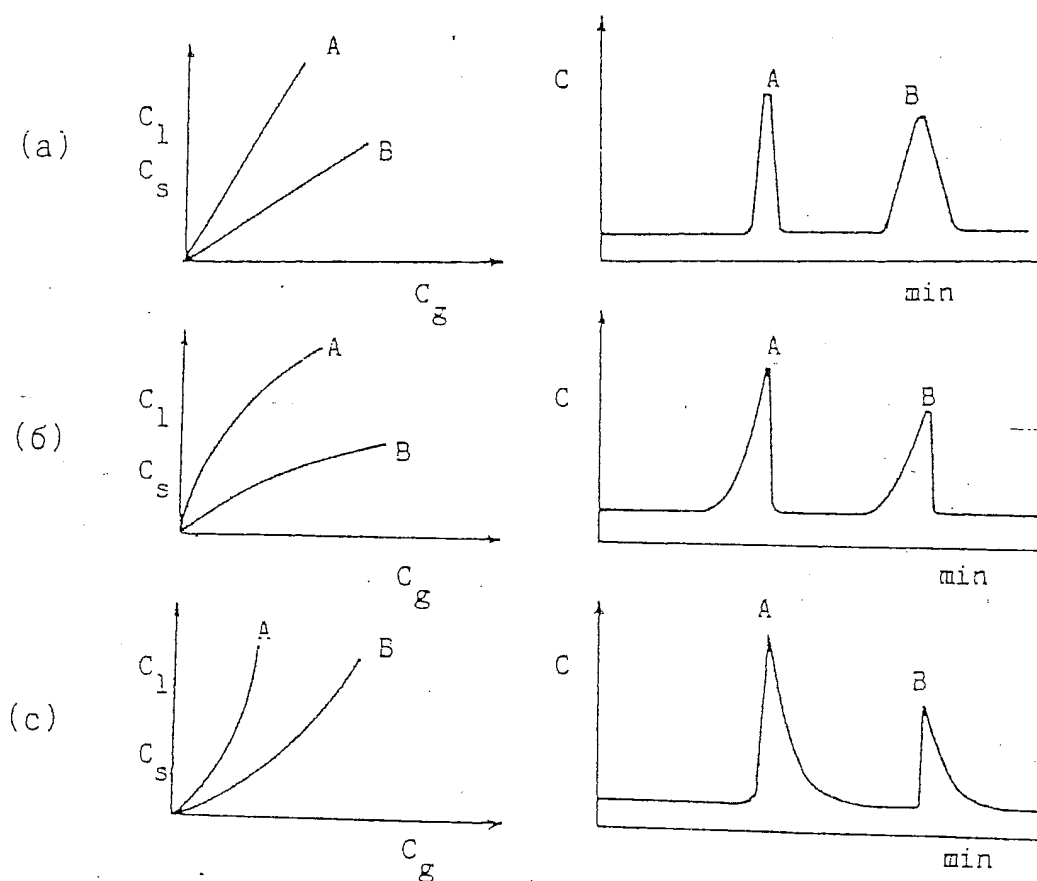
Гасната хроматографија е физички метод на разделување компоненти од некоја смеса помеѓу подвижна гасна фаза и неподвижната цврста или течна фаза. Во зависност од агрегатната состојба на неподвижната фаза, постојат два типа гасна хроматографија: гасно – апсорпциона хроматографија која се обележува со **GSC** (*gas solid chromatography*) и гас–распределбена хроматографија **GLC** (*gas liquid chromatography*). Кај **GSC**, неподвижната фаза е активан цврст апсорбенс, а основен процес на разделување на компонентите од пробата е апсорпцијата. Феноменолошки тоа е апсорпциона хроматографија. Кај **GLC** неподвижната фаза е тешко испарлива течност разлеана преку некоја цврста подлога со голема површина. Основниот процес е распределба и феноменолошки тоа е распределбена хроматографија. Сите закони што важат за апсорпцијата и распределбата ќе важат во гасната хроматографија.



Уред за гасна хроматографија

3.1. Теоретски основи на гасната хроматографија

За да може да се даде теоретско толкување на овие процеси треба да се претпостави дека постои рамнотежа на испитуваните компоненти во подвижната и неподвижната фаза. Кај **GLC** хроматографијата односот на рамнотежните концентрации во подвижната и неподвижната фаза е даден со **Nernst – овата равенка** $K = C_p / C_s$. Во идеален случај, кога **K** не зависи од концентарцијата на C_p и C_s , се добива линеарна изотерма (сл. а.). Експериментално, ваква изотерма обично се добива за разредени системи, односно за мали концентрации на C_p и C_s , при што детекторот ќе даде добро дефинирани и симетрични пикови. Во случај кога **K** се менува со односот на концентрациите C_p и C_s , се добиваат нелинеарни изотерми (сл. б. и сл. с.). Добивањето нелинеарни изотерми е доста чест случај во **GSC** хроматографијата. Обликот на кривите (сл. б.) одговара на **Langmuir – овите** изотерми, додека формата на кривите (сл. с) одговара на **Froindlich – овите** изотерми. И кај двата типа криви детекторот дава асиметрични пикови.



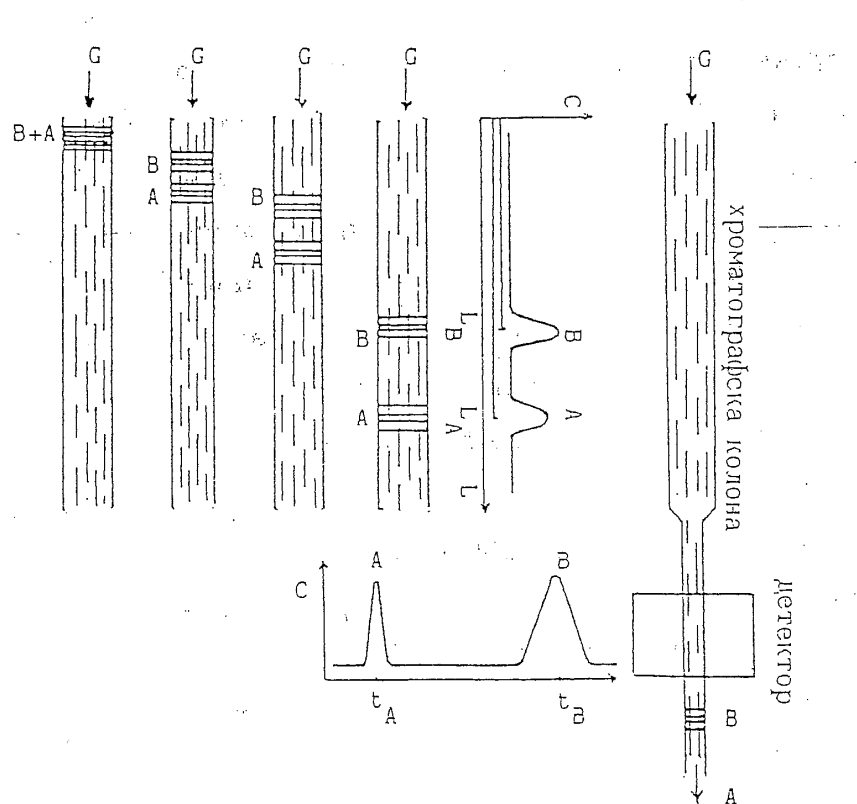
а) Линеарни изотерми со симетрични пикови

б) Нелинеарни Langmuir – ови изотерми со асиметрични пикови

в) Нелинеарни Froindlich – ови изотерми со асиметрични пикови

Основниот принцип на разделување во гасната хроматографија е прикажан на сликата погоре. Испитуваната смеса влегува во хроматографска колона и во неа се разделува на составните компоненти кои имаат различно време на задржување во колоната, како резултат на различната адсорпција (**кај GSC**) или различните вредности на коефициентот на распределба (**кај GLS**). Потоа, компонентите, сите при различни временски интервали, излегуваат од колоната заедно со гасот носител кој истовремено претставува и елуент. Како што претходно спомнавме, во хроматографската анализа

постојат три техники на разделување: фронтална анализа, анализа со истиснување и елуентна анализа. Најчесто користена е последната, при што инертниот гас носител е растварач и елуент. На тој начин, хроматографската колона ќе биде испрана по завршувањето на една анализа и веднаш спремна за друга анализа. Ова значи дека гасот носител, носејќи ја испитуваната проба најпрво ги создава зоните, а потоа колоната ја пере од нив, однесувајќи ги со себе надвор од колоната разделените компоненти.



Создавање зони и регистрирање на гасниот хроматограм:

G – гас носител; B и A – компоненти на пробата; L_A и L_B – измината должина на колоната A и B ; t_A и t_B – време на детекција на A и B .

Со гасната хроматографија може да се изведуваат квалитативни и квантитативни анализи на раздвоените компоненти како и да се определуваат поголем број физичко – хемиски и термодинамички параметри на испитуваната проба. За таа цел најнапред треба

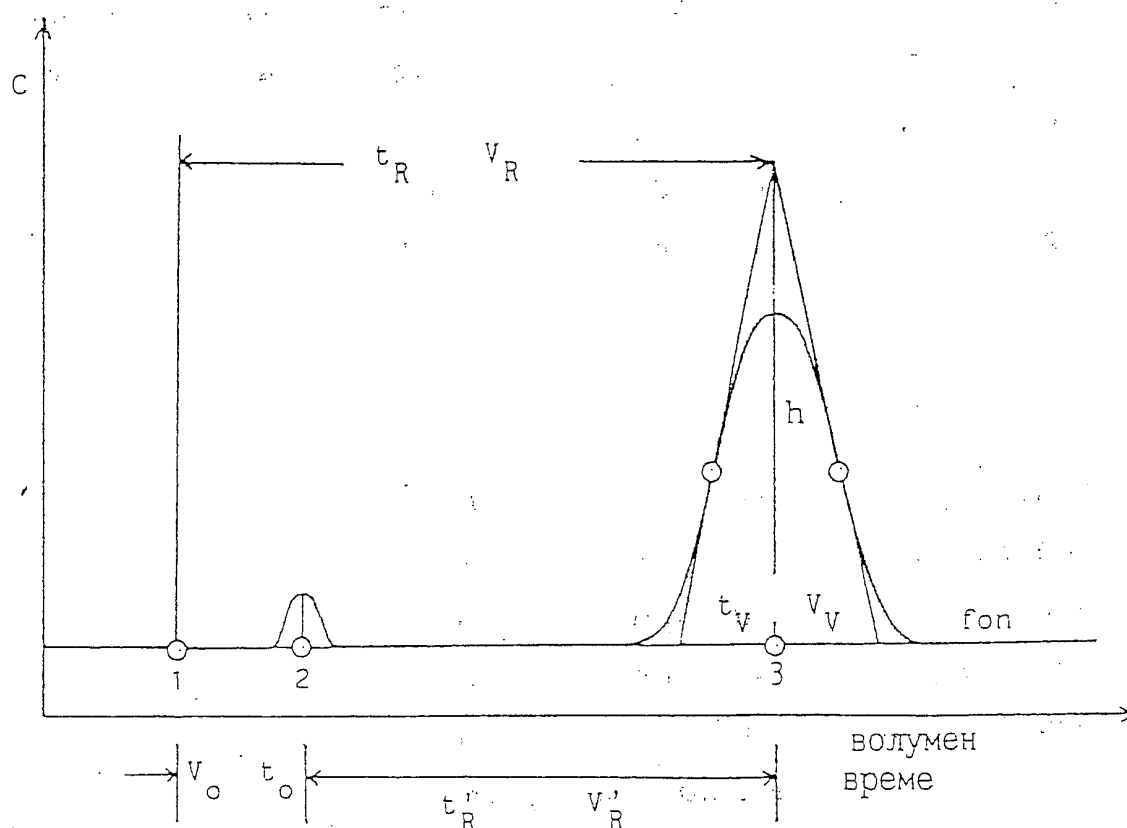
да се изврши анализа на добиениот хроматограм, да се покаже кои се параметри може да се прочитаат од него и потоа да се дефинираат прочитаните параметри.

3.2. АНАЛИЗА НА ХРОМАТОГРАМ

На сликата подолу има претставено еден идеализиран хроматограм кои што е добиен при елуирање на една компонента. На апсцисната оска е дадено времето на елуирање или волуменот на инертниот гас носител (чиј проток е константен), а на ординатата одговорот на детекторот (концентрација или mV).

Основната или нултата линија (фон) претставува одговор на детекторот од подвижната фаза на чистиот гас носител. Во точката 1 во хроматографската колона се внесува испитуваната проба, при што неизбежно е внесување макар и на некое минимално количество воздух или друг инертен гас кој влегува паралелно со пробата. На точката 2 се појавува мал пик на инертниот гас кој не се апсорбирал во колоната и кој има иста брзина како и брзината на гасот носител. Времето потребно воздухот (кој не се задржува на неподвижната фаза) да помине од местото на внесување во хроматографската колона до местото на детекција, се вика **време на поминување и се обележува со t_0** . Внатрешниот волумен на гасната фаза во колоната плус мртвиот волумен на уредот се обележува со V_0 , од каде произлегува дека V_0 е волумен на задржување на неапсорбираниот гас.

Во точката 3 се појавува изразен пик на изелуираната компонента која, поради адсорпцијата, се задржала извесно време во колоната. Кривата на изелуираната компонента (пикот) има форма на **Gaus – овата крива** на распределба. Формата на овој пик за реален систем ќе зависи од вредноста на коефициентот на распределба, а неговата висина (h) е растојание помеѓу фонот и врвот на пикот, t_v е растојание помеѓу пресечните точки на фонот и тангентите повлечени од точките на инфлексија. Висината на пикот е функција од концентрацијата на елуираната компонента, а површината под пикот е право пропорционална со неа.



Основни параметри на еден хромтограм

1 – внесување проба; 2 – воздушен пик; 3 – изелуирана компонента, t_0 – време на поминување на инертниот гас; V_0 – внатрешен волумен на гасната фаза + мртов волумен на колоната; t_R – време на задржувањето (ретенционо време); V_R – волумен на задржувањето (ретенционен волумен); V_R – редуциран волумен на задржување; t_R – редуцирано време на задржувањето $t_V = 4\theta$ и $V_V = 4\theta$ - ширина на пикот.

Време на задржување или ретенционо време t_R – претставува време од внесувањето на пробата до појавата на максимумот на пикот. Тоа зависи од природата на изелуираната компонента, природата и количината на неподвижната фаза, мртвиот волумен во хроматографскиот систем, волуменот на гасот носител, големината на протокот, разликата во притисоците по должината на колоната и температурата. Ако

ретенционото време се корегира за времето на поминување t_0 , се добива редуцирано ретенционо време t_R :

$$t_R = t_R - t_0$$

Волумен на задржување или ретенционен волумен V_R – е потребниот волумен на гасот носител за да може од колоната да излезе некоја од разделените компоненти на испитуваната проба. Тоа е волумен од моментот на влезот на пробата во колоната до излезот на некоја раздвоена компонента. Ако t_R се помножи со протокот на инертниот гас носител F_C , се добива ретенционен волумен:

$$V_R = F_C \cdot t_R$$

Ако t_R се помножи со протокот на инертниот гас носител F_C , се добива редуциран ретенционен волумен:

$$V_R = F_C \cdot t_R = V_R - V_O$$

Чист или вкупен ретенционен волумен V_C – се добива кога редуцираниот ретенционен волумен ќе се помножи со некој фактор j кој врши корекција на градиентот на притисокот по должината на колоната:

$$V_C = j \cdot V_R = (V_R - V_O) \cdot j$$

каде што:

$$j = \frac{3 \cdot (P^2 - 1)}{2 \cdot (P^3 - 1)} \quad \text{при што} \quad P = \frac{P_1}{P_2}$$

P_1 и P_2 – притисоци на гасот носител на влезот и на излезот од колоната.

Специфичен ретенционен волумен V_s . Ретенциониот волумен во голема мерка зависи од количеството на стационарната течна фаза и температурата во колоната. За да се земат предвид овие два фактора, воведена е големината на специфичен ретенционен волумен.

$$V_s = \frac{V_C \cdot 273}{T \cdot C_L}$$

каде што C_L е тежина на течната фаза во колоната, а T температура на колоната.

Корегираното време на задржување t_R^o - се добива кога експерименталното добиено време на задржувањето ќе се помножи со факторот J .

$$t_R^o = t_R \cdot j$$

Корегиран волумен на задржување V_R^o - се добива кога експериментално добиениот волумен на задржување се помножи со факторот J .

$$V_R^o = j \cdot V_R = j \cdot t_R \cdot F_C = t_R^o \cdot F_C$$

Мртов волумен V_m . Во хроматографскиот апарат вкупниот волумен што го зафаќа гасот носител е :

$$V_{BK} = V_{КОЛ} + V_{ИСПАРУВАЧ} + V_{КОМУНИКАЦИИ} + V_{ДЕТЕКТОР}$$

Од V_{BK} само $V_{КОЛ}$ е активен волумен, односно волумен на кој се одвива хроматографскиот процес.

Другите волумени ($V_{ИСПАРУВАЧ}$, $V_{КОМУНИКАЦИИ}$ и $V_{ДЕТЕКТОР}$) низ кој поминува гасот носител се неактивни волумени и претставуваат мртов волумен, т.е. :

$$V_m = V_{ИСПАРУВАЧ} + V_{КОМУНИКАЦИИ} + V_{ДЕТЕКТОР}$$

Според тоа, во волуменот на задржување на неапсорбираниот гас V_0 удел има и мртвиот волумен.

Волуменот на гасот носител во колоната, што всушност претставува активен волумен на гасот се добива од равенката:

$$V_C = V_0 * j$$

V_C – претставува слободен волумен на хроматографска колона, кој може да го заземе гасот носител. Според тоа, V_C е волумен на гасот носител во колоната.

Коефициент на распределба. Кога испитуваната проба влегува во колоната, таа веднаш се распределува во согласност со **Нернстовиот закон** и се воспоставува динамичка рамнотежа во испитуваната проба помеѓу стационарната течна фаза и подвижната гасна фаза. Концентрацијата на испитуваната проба, во секоја од фазите, е дадена преку коефициентот на распределба:

$$K = \frac{C_s}{C_c}$$

C_s и C_c се концентрации на пробата во стационарната течна фаза и подвижната гасна фаза.

Ако $K = 1$, испитуваната проба за време на нејзиното поминување низ колоната е рамномерно распределена помеѓу двете фази (половина време во гасната фаза, а половина време во течната фаза).

Ако се земе предвид дека специфичниот ретенционен волумен V_s претставува однос на чистиот ретенционен волумен V_C (кој претставува волумен на гасна фаза) и C_L , што претставува тежина на течната фаза, коефициентот на распределба може да се пресмета и од изразот:

$$K = \frac{V_C \cdot 273}{T \cdot C_L} P_L \left[\frac{T}{273} \right] = V_S \cdot P_L \left[\frac{T}{273} \right] = \frac{V_C}{V_L}$$

P_L – густина на течната фаза на температура T на колоната.

Експериментално, коефициентот на распределба се определува по равенката:

$$V_R^o = V_C + V_L \cdot K \quad \text{или} \quad K = \frac{V_R^o - V_C}{V_L}$$

каде што V_L е волумен на течната фаза во хроматографската колона.

Фактор на ретенција или фактор на селективност α . Стационарната фаза е толку поселективна колку е поголема разликата на ретенционите времиња на разделуваните компоненти. Селективноста на стационарната фаза се одредува преку факторот на ретенција. За двокомпонентниот систем **A** и **B** тој ќе биде:

$$\alpha = \frac{t_{R_B}}{t_{R_A}} = \frac{V_{C_B}}{V_{C_A}} = \frac{K_B}{K_A}$$

Кога $\alpha \gg 1$ или $\alpha \ll 1$, селективноста е поголема.

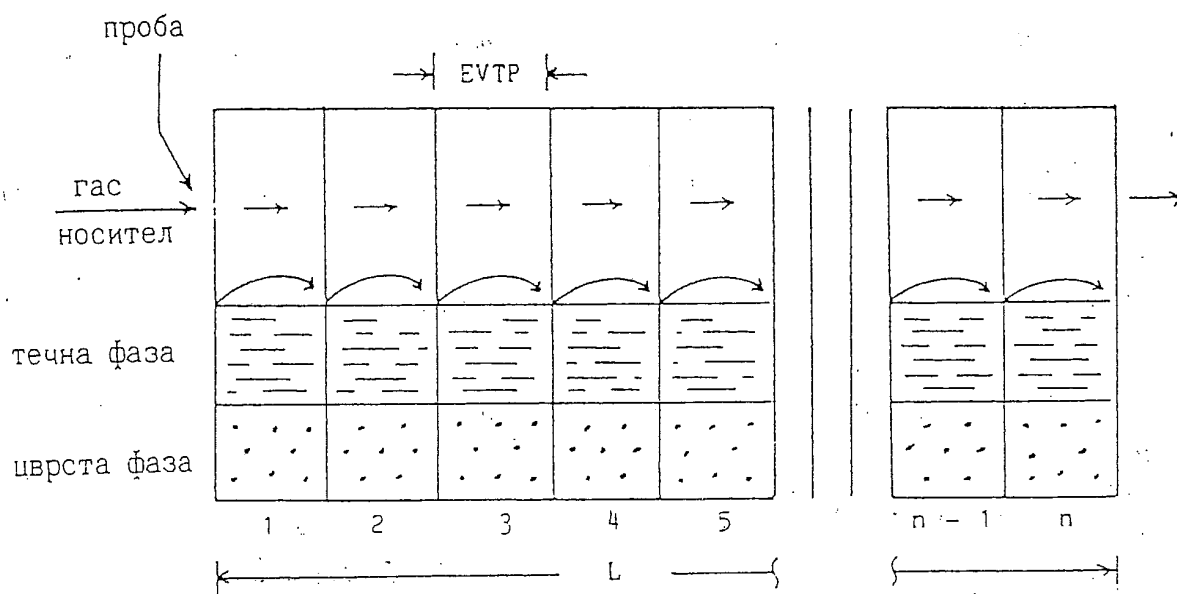
Ефикасност на хроматографската колона

Под ефикасност на хроматографската колона се подразбира способноста на колоната во целост да ги раздвои компонентите од испитуваната проба. Таа се изразува преку бројот на теоретските подови. **Под теоретски под** се подразбира оној најмал замислен дел (елемент) од хроматографската колона чиј волумен е доволно голем за во него, при распределбата на испитуваната проба, да може да се постави рамнотежа помеѓу подвижната и неподвижната фаза. За да може да се пресмета бројот на замислените подови и за да може да се постават некои математички зависимости, треба да се постави модел на идеализирана хроматографска колона, кој треба да ги исполнува следниве услови.

- А) Цврстиот носител на неподвижната фаза да е апсолутно инертен;
- Б) Протокот на гасната фаза по целата должина на колоната да е константен;
- В) Притисокот на гасот да е константен и да е ист на влезот и излезот;
- Г) Да нема мртов волумен;
- Д) Да нема процеси на дифузија

Ако испитуваната проба се внесе во теоретски замислениот изолиран прв под, таа ќе се распредели помеѓу гасната и течната фаза кои се наоѓаат во рамнотежа, за што важи **Нернстовиот закон** за распределба:

$$C_{\text{НЕПОДВИЖНА ФАЗА}} \times V_{\text{НЕПОДВИЖНА ФАЗА}} = C_{\text{ПОДВИЖНА ФАЗА}} \times V_{\text{ПОДВИЖНА ФАЗА}}$$



Шема на хроматографска колона со теоретски подови:

L – должина на колоната; $EVTP$ – еквивалентна висина на теоретскиот под;

n – број на подовите;

Доколку во некој временски интервал во првиот теоретски под навлезе ново количество на гасот носител dv (а бидејќи гасот има константен проток) $dv = V_g$, каде што V_g е волумен на гасот што постои во секој теоретски под и е во рамнотежа со течната фаза. Со влегувањето на dv во првиот теоретски под, постојниот гас со волумен V_g од првиот теоретски под ќе биде истиснат и ќе премине во вториот, заедно со молекулите или јоните на испитуваната проба кои се распределени во гасната фаза. Сега повторно се воспоставува рамнотежа помеѓу гасната и течната фаза. Ова поместување оди каскадно, така што идентично количество на гас dv излегува од последниот теоретски под на колоната и влегува во детекторот. На тој начин, со преминување на испитуваната проба од под во под количеството на испитуваната супстанција која во даден момент би се наоѓала во секој од теоретските подови, може да се пресмета со развивање на биномната равенка:

$$\left[\left(1 - \frac{dv}{V_{ef}} \right) + \frac{dv}{V_{ef}} \right]^V$$

Каде што $V_{ef} = V_g + V_f \cdot K$ или $V_R = n \cdot (V_g + V_f \cdot K)$

V – број на елуираната низ еден теоретски под, односно број на поминатите волумени dv низ еден теоретски под;

V_g и V_f – волумени на течната и гасовитата фаза во еден теоретски под.

Бројот на теоретските подови може да се пресмета од равенката:

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{t_V} \right)^2$$

Вредностите на t_R и t_V се читаат од снимениот хроматограм. Ако должината на колоната L се подели со бројот на теоретските подови n , се добива *еквивалентна висина на теоретскиот под-EVTP*:

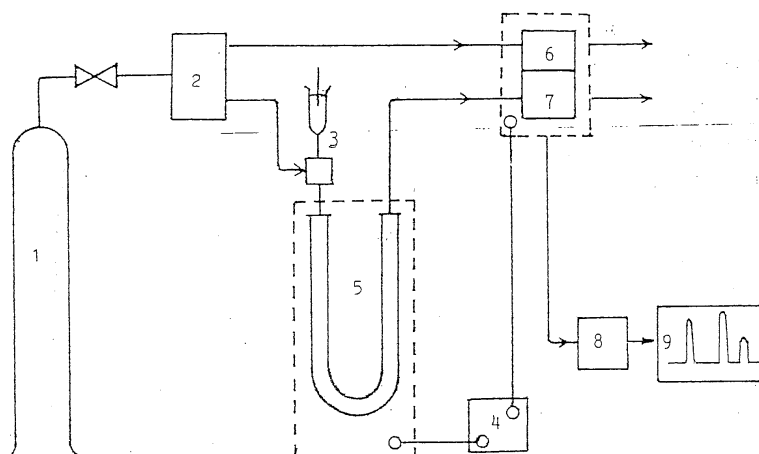
$$EVTP = \frac{L}{n}$$

Под **EVTP** се подразбира онаа минимална должина на хроматографската колона каде се воспоставува целосна фазна рамнотежа. **EVTP** е различна за секоја испитувана проба и за секоја количина. Колку **EVTP** е помала за дадена должина на колоната **L**, односно што почесто се воспоставува фазната рамнотежа, бројот на теоретските подови расте, а колоната подобро го извршува разделувањето.

Кај реална хроматографска колона, врз големината на **EVTP** влијаат повеќе параметри, како што се: дифузија во гасната и течната фаза, дебелината на течниот слој, хомогеното полнење на колоната, брзината и природата на гасот носител

Опис на апаратурата на гасната хроматографија

На оваа шема подетално ќе ги опишеме составните делови на гасната хроматографија.



Шематски приказ на гасен хроматограф:

1 – боца со инертен гас (гас носител); 2 – регулатор на проток; 3 – инјектор на проба; 4 – терморегулатор; 5 – хроматографска колона; 6 и 7 – детектори на гасот за носител и елуираниот гас со пробата; 8 – амплификатор; 9 – регистратор

Принципот на работа на гасениот хроматограф е следен: од боцата 1 што се наоѓа под притисок и претставува извор на перманентен проток на гасот носител, преку регулаторот 2 низ хроматографската колона се пушта одреден проток на гас, Преку инјекторот 3 се инјектира испитуваната проба која заедно со гасот носител, влегува во хроматографската колона. Во хроматографската колона се врши разделување на компонентите по пат на апсорпција (**кај GSC**) или по пат на распределба (**кај GLC**). После разделувањето, компонентите се промиваат (елуираат) со самиот гас носител кој перманентно поминува низ колоната. Како што е познато, компонентите во колоната се задржуваат различно време поради што во различни временски интервали, влегуваат во детекторот (**6 и 7**) и, преку електронскиот амплификатор 8, на регистарот 9 се регистрира концентрацијата на секоја од компонентите. Целиот овој процес на добивање гасен хроматограм, почнувајќи од инјектирањето на пробата па се до нејзиното регистрирање, трае од **10 секунди до 20 минути**.

Уред за обезбедување константен притисок на гасот носител

Гасот носител во хроматографската колона обично се доведува од гасната боца 1 што се наоѓа под висок притисок. Преку редукциониот вентил и цевката во која се наоѓа средството за чистење и сушење на гасот, со помош на регулаторот 2, се регулира протокот и притисокот на гасот што влегува во колоната. Најчесто употребувани гасови се: хелиум, водород, азот и аргон. Ако детекторот работи на принципот на топлинска спроводливост, тогаш најупотребувани се хелиумот и водородот поради нивната висока топлинска спроводливост. Овие гасови имаат и низок вискозитет што овозможува постигнување големи брзини на протокот при пониски притисоци во колоната. Брзината на гасот најчесто се движи помеѓу **10 и 100 ml/min**. Брзината се регулира според времето на задржување на одделни компоненти во колоната.

Хроматографска колона

Еден од најбитните делови на хроматографската апаратура е хроматографската колона во која се врши разделувањето на испитуваната проба. Точноста и прецизноста на резултатите зависат од правилното работење со колоната. Најчесто колоните се направени од метални, стаклени или пластични цевки во форма на буквата **U** или во форма на спирала. Должината и дијаметарот на колоната се одредуваат во зависност од целта на нејзината намена. Колку должината е поголема толку ефикасноста на колоната е поголема. Со капиларни колони, чиј внатрешен дијаметар е од **0.1 до 0.5 mm** и должина од **200 m**, се постигнува најголема селективност. **ЕВТР** кај овие колони се движи од **0.2 до 1 mm**. Селективната течност е нанесена по внатрешните сидови на капиларот, а низ средината на капилрот поминува гасот носител. За аналитички цели се користат колони со дијаметар од **2 до 4 mm** и должина од **0.5 до 6 m**. Тие се исполнети со инертен цврст носител, импрегниран со течен филм од селективна течност. **ЕВТР** кај овие колони е од **0.5 до 2 mm**. Најшироките колони (од **6 до 500 mm**) со должина од **1 до 5 m**, се користат за препаративни цели, но нивната селективност е мала. Нивните **ЕВТР** се движат од **1 до 5 mm**.

Течна фаза. Како течна неподвижна фаза во гасната хроматографија можат да се користат органски или неоргански супстанции кои ги исполнуваат следниве услови: **а)** низок напон на пареите при собна температура, **б)** хемиска инертност спрема цврстиот носител и компонентите на испитуваната проба, **в)** висока селективност и стабилност при повисоки температури. Количеството на течната фаза мора да биде оптимално поради влијанието на дебелината на филмот **d_f** врз ефикасноста на разделувањето. Колку **d_f** е помало **ЕВТР** е помало, а разделувањето е поефикасно. Волуменот на задржување ќе зависи од количеството на течната фаза. Со намалувањето на волуменот на течната фаза се продолжува трајноста на хроматографската колона. Течната фаза мора да биде во количество што ќе го прекрие зрното на носителот со мономолекулатен слој. Најчесто користени течности се: тетраизобутиленот, диметилсулфоланот, тетраетиленгликолот, диметилетерот и др.

Температура на колоната. Како оптимална работна температура се смета температурата која за $10 - 20^{\circ} \text{C}$ е пониска од средната температура на вриење на испитуваната проба. Зголемувањето на температурата го намалува коефициентот на распределба, а со тоа се зголемува брзината на излегувањето на компонентите од колоната, односно се намалува времето на задржувањето.

Зависноста помеѓу волуменот на задржувањето и темепературата на колоната е дадена со равенката:

$$\log V_g = \frac{A}{B + T_c} + C$$

каде што **A**, **B** и **C** се константи, експериментално определени, валидни само за определен температурен интервал и дадена фаза.

ДЕТЕКТОР

Врз база на некое физичко или хемиско својство од изелуираната супстанција, се регистрира нејзиното присуство во гасот носител. При детекција можат да се користат следниве својстава и методи: топлинска спроводливост, електрична спроводливост, потенциометриски титрации, радиоактивност, пламена фотометрија и фотојонизација, **IR** и **UV** спектрофотометрија, масена спектрометрија и др.

Според начинот на регистрирање на концентрацијата на изелуираната компонента, детекторите се делат на интегрални и диференцијални. Со интегрални детектори се регистрира вкупната концентрација од почетокот на регистрирањето до моментот на разгледувањето. При тоа се добива скалест хроматограм, кај кои растојанието помеѓу два хоризонтални дела од кривата е пропорционално на масата на изелуираната компонента во временски интервал.

Со **диференцијални детектори** се добиваат податоци за составот и концентрацијата на изелуираната компонента во моментот на читањето. Овие податоци се прикажуваат во вид на пикови, при што позицијата на секој пик одговара на некоја компонента од смесата што се анализира, а висината, поточно површината на пикот е пропорционална на концентрацијата на изелуираната компонента. Во поново време практично се употребуваат само диференцијалните детектори.

Според принципот на работа, детекторите се делат на концентрациони (**на пр. катарометри**) и проточни (**јонизациони детектори**). Кај концентрациските детектори сигналот е пропорционален на концентрацијата на изелуираната компонента. Ако се промени брзината со која се движи гасот носител, ќе се промени и површината под пикот додека пак неговата висина останува иста. Кај проточните детектори сигналот е пропорционален на бројот на молекулите од изелуираната компонента. Ако се промени брзината со која се движи гасот носител, ќе се промени и површината под пикот додека пак неговата висина останува иста. Кај проточните детектори сигналот е пропорционален на бројот на молекулите од изелуираната компонента што влегле во детекторот.

Катарометар. Детектор кој има најширока примена во гасната хроматографија е катарометарот. Тој е осетлив скоро на сите типови проби (не е селективен), има едноставна изведба, а со тоа и ниска цена на чинење.

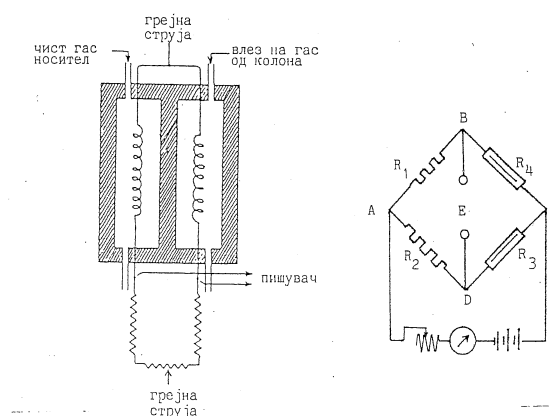
Катарометарот е детектор кој работи на принципот на мерење на разликите во топлинската спроводливост помеѓу чистиот гас носител кој излегува од колоната заедно со испитуваната проба. Тој се состои од две ќелии (мерна и референтна), еднакви по форма, а во секоја од ќелиите се наоѓа метална жица од волфрам-платина, со дијаметар од **20 до 30 μm** .

Жиците од двете ќелии се поврзани со уште два отпорника во еден **Westono-ов мост**, жиците се загреваат на некоја константна температура ако низ нив тече константна струја. Ако се земе предвид дека отпорот на жиците расте со температурата, а низ жиците

тече константна струја, јасно е дека со промената на температурата ќе се менува напонот на краевите од жицата.

Бидејќи е тешко мерењето на апсолутната вредност на топлинската спроводливост на гасот, вообичаено е да се изведуваат релативни мерења на гасот носител со пробата што струи низ мерната ќелија во однос на чистиот гас носител кој струи низ референтната ќелија.

Во почетокот, низ мерната и референтната ќелија се пропушта константен проток од чист гас носител. Потоа се врши балансирање на мостот, на тој начин што од изворот на еднонасочна струја се задава некоја потенцијална разлика помеѓу точките **A** и **C**, се додека потенцијалната разлика помеѓу точките **B** и **D** не стане 0.



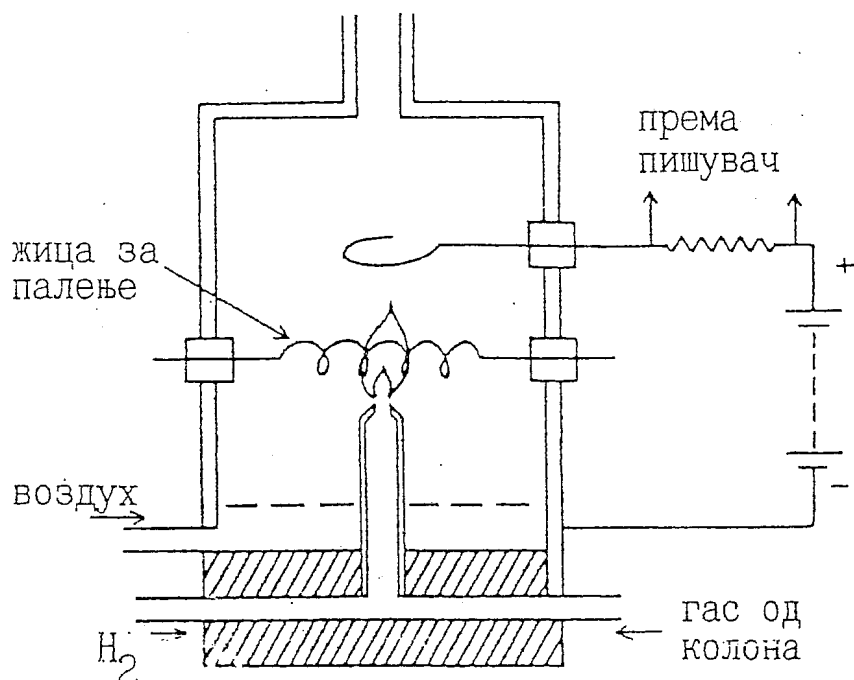
Катарометар

а) референтна и мерна ќелија; б) електрична шема

Еден катарометар се смета за добар ако неговата чувствителност е од **500 до 1000 $\text{mV cm}^3 / \text{mg}$** и може да определува примеси чие количество е 10^{-6} грама.

Јонизациони детектори. Благодарение на високата чувствителност, малата инертност, широкиот линеарен дијапазон, јонизационите детектори се, исто така, често употребувани во гасната хроматографија. Јонизационите детектори се базираат на мерење на електричната спроводливост на гасовите што директно е пропорционална на

количеството на јонизирани честици во гасот. При нормални услови гасовите се изолатори, меѓутоа тие можат да се јонизираат и потоа да се мери електричната спроводливост на јоните. Како извор на јонизација, обично, се користат: радиоактивни изотопи или водороден пламен. На шемата е прикажан принципот на работа на еден пламен јонизационен детектор.



Шематски приказ на пламен јонизационен детектор

Во пламеникот влегува смеса од водород и гасот што излегува од хроматографската колона во однос **1 : 1**. На горната страна на пламеникот се наоѓаат 2 паралелни електроди кои се под истонасочен напон од **100 до 300 V**. Во пламеникот, чија температура е **1000 – 2000 ° C** согоруваат компонентите од пробата. При согорувањето се создаваат позитивни и негативни јони и слободни електрони. Јоните патуваат кон спротивно наелектризираните електроди и на тој начин се создава сигнал кој е пропорционален на количеството на пробата.

Пламено – јонизационите детектори може да се користат само ако испитуваниот примерок е од органска природа.

Освен **пламено – јонизациони детектори**, постојат и други типови јонизациони детектори, како што се алкалните, органските, потоа детекторите што работат на принцип на „фаќање“ електрони и др. Секој од нив има специфична примена.

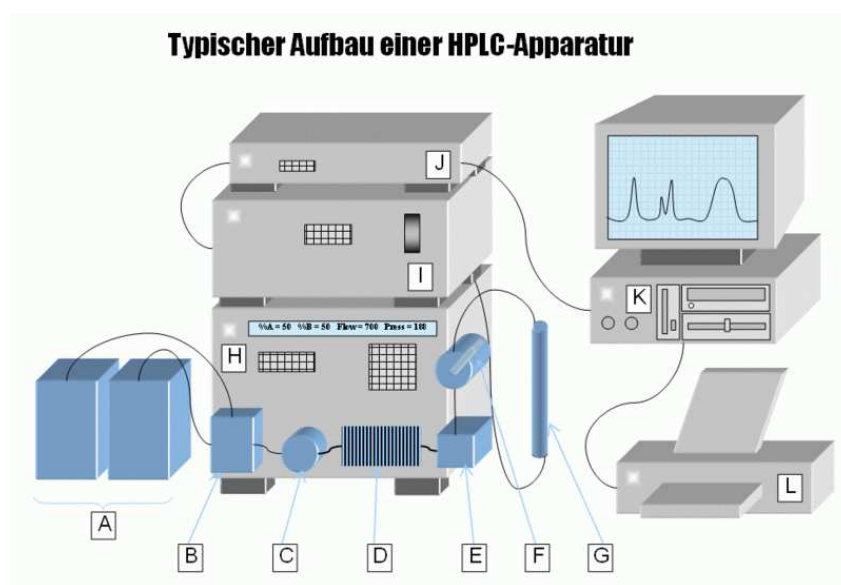
Регистратори

Одговорот на детекторот, преку засилувач се пренесува врз регистраторот кој може да биде осцилоскоп, пишувач и др., на кој се регистрира хроматограм. Пишувачот има повеќе скали на осетливост. Тој треба да биде линеарен во целото подрачје на сите скали, да има систем за менување на брзината на движењето на хартијата, и да има мала инерција. Со пишувачот се испорачуваат и електронски интегратори што директно ја мерат површината под пиковите од изелуираните компоненти. Електронските интегратори регистрираат импулси, а секој импулс одговара на мал инкремент на површина. Од бројот на регистрираните импулси се одредува површината под пикот. Во поново време се прават интегратори на кои, наместо површината под пикот директно се чита количеството на испитуваната компонента.

4. ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА

Течната хроматографија или како уште се нарекува „високо притисочна течна хроматографија“ скратено се обележува со **HPLC**, според англискиот назив ***High pressure liquid chromatography***. Овој тип хроматографија порано се изведувал во класични колони. Во овие колони ефектот на разделување на одделни компоненти од испитуваната проба се извршувал при релативно мали брзини на проток на течната фаза. Земајќи предвид дека апсорпцијата и распределбата на испитуваната проба во течната подвижна фаза и цврстата или течната неподвижна фаза се контролирани од брзината на дифузијата (што претставува релативно бавен процес), ефективно разделување било можно само при бавни

брзини на подвижната фаза, така што самиот хроматографски процес трае подолго време. Високопритисочната течна хроматографија (**HPLC**) претставува модерна аналитичка техника кој која мобилната фаза се доведува со користење на пумпи под притисок. Колоните во **HPLC** се полнат со SiO_2 или со некои полимери.



Шема на инструмент за течна хроматографија

Материјалите што најчесто се користат во пакувањата во **HPLC** колони се микропартикуларни силикати. Тоа се мали порозни силикатни делови со сверна или неправилна форма и нормален дијаметар од **3,5 до 10 μm** . Тие се изработени така да имаат ограничена големина и сиромашна распределба на големина. Според големината, микропартикуларните силикати наликуваат на фина прашина.

Материјалите за силикатно пакување се достапни како порозно наредени зрнца. Тие се состојат од неподвижно сферно јадро од стакло или пластика, **30 – 40 μm** дијаметар, со тенка надворешна обвивка од силикат или модифициран силикат.

Постојат недостатоци на употребата на силикати, особено кај големи вредности на **pH**, и за да се надмине овој проблем развиени се други материјали за пакување. Тие се базираат на флуорокарбони, карбони, алуминиум или полимерични смоли.